

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XL, HEFT 2
MIT 80 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 26. JULI 1951



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1951

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 640 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

*Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich*

oder an

*Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, Russ. Zone*

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Kosten für etwa nötige Umzeichnungen werden dem Verfasser in Rechnung gestellt. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist ein Unkostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

Die Aufnahme von Artikeln, welche bereits an anderer Stelle in wörtlich oder auch nur inhaltlich gleicher Fassung publiziert worden sind, wird abgelehnt. „Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Jänner desjenigen Jahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Der Verfasser verpflichtet sich also, innerhalb dieser Frist seinen im Protoplasma abgedruckten Beitrag nicht anderweitig zu veröffentlichen.

Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Beiträge kostenlos und können weitere (bis zu 200) gegen angemessene Berechnung beziehen. Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Springer-Verlag, Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien

XL. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Abhandlungen

Seite

Schmidt, Heinz-Herbert. Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten.	209
Spek, Josef. Über das optische Verhalten von Safraninen und Aposafraninen in den verschiedenen Komponenten des Protoplasmas	239
Kropfisch, Maria. Äpfelgas-Wirkung auf Stomatanzahl.	256
Kropfisch, Maria. UV-Bestrahlung und Stomatanzahl.	266
Lipp, Walther. Versuch einer physiko-chemischen Analyse der Silberimprägnationsmethode nach Bielschowsky-Gros	275
Ziegenspeck, Hermann. Die Leptonik erklärt den duktilen Bau der Lianen-Sprosse von <i>Clematis Vitalba</i> L.	298
Seifriz, William. A Molecular Interpretation of Toxicity	313
Abele, Karl. Über die Volumenabnahme des Zellkernes in der Plasmolyse und über das Zustandekommen der Kernplasmarelation	324
Härtel, Otto. Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte.	338
Müekschitz, Gertrud. Zur zellphysiologischen Analyse der Blütenbewegungen.	348

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten

I. Untersuchungen über die Vakuolenbildung der Chloroplasten durch Alkaloide und Anaesthetica

Von

Heinz-Herbert Schmidt

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. W.)

Mit 17 Textabbildungen

(Eingelangt am 24. Januar 1951)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	209
B. Vakuolenbildung der Chloroplasten durch Alkaloide und Anaesthetica . . .	210
I. Methodik	210
II. Versuche mit Wasserpflanzen	211
1. Die Wirkung verschiedener Alkaloide auf die Chloroplasten von <i>Helodea canadensis</i>	211
2. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Wasserpflanzen . . .	213
3. Nachweis des Zuckers in den Plastidenvakuolen	214
4. Osmotische Werte der Plastidenvakuolen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit	218
5. Bestimmung der Assimilationstüchtigkeit von Sprossen mit vakuolierten Plastiden mittels der Winkler-Methode der O ₂ -Bestimmung .	220
III. Versuche mit Landpflanzen	227
IV. Besprechung der Ergebnisse	231
C. Zusammenfassung der Ergebnisse	234
Literatur	236

A. Einleitung

Die mikroskopische und submikroskopische Struktur der Chloroplasten ist in den letzten Jahren durch die Arbeiten von Heitz (1932, 1936 a u. b), Hubert (1935 a u. b), Doutreligne (1935), Wieler (1936), Weier (1936 a u. b), Geitler (1937), Frey-Wyssling (1938 a u. b), Menke und Koydl (1939), Menke (1940 a u. b), Kausche und Ruska (1940), Roberts (1942) und Strugger (1947 u. 1950) ziemlich weitgehend erforscht worden. Auch Plastidenanomalien sind häufig beobachtet worden (vgl. Küster 1937). Die experimentellen Bedingungen aber, unter denen diese zuverlässig hervorgerufen werden können, sind vielfach unbekannt. Ebenso wird die Frage, ob anormale Chloroplasten nur als Artefakte aufzufassen sind oder ob sich aus den Struktur- und Formwechsellerscheinungen Rückschlüsse auf

die innere Struktur und den physiologischen Zustand der Chloroplasten ziehen lassen, nur in den seltensten Fällen gestreift; die Frage, inwieweit eine Veränderung der normalen Plastidenstruktur die Assimilation beeinflussen kann, wird kaum in einer Arbeit aufgeworfen.

Eine wichtige Arbeit zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten lieferte Lärz (1942). Er konnte beobachten, daß die Chloroplasten von Wasserpflanzen, sofern sie in Nikotin-, Cocain-, Coniin- oder Atropinlösungen belichtet wurden, aufquollen und Vakuolenbildungen zeigten. Diese progressive Vakuolenbildung während der Belichtung in Alkaloiden, d. h. die Abhängigkeit der Vakuolenbildung von der Photosynthese, welche Lärz durch eine Hemmung der Assimilation mittels Phenylurethan, tiefe Temperaturen und Plasmolyse experimentell nachweisen konnte, ist für die Erforschung der Physiologie der Chloroplasten äußerst wichtig und dürfte ein grundlegender Ausgang dafür sein, eine Methode zu finden, die Assimilationsfähigkeit einzelner Chloroplasten zu prüfen. Bauer (1943) und Hanssen (1947) konnten die Untersuchungen von Lärz bestätigen und z. T. weiter ausbauen. Wichtig ist vor allem die Feststellung von Hanssen, daß die Vakuolenbildung der Chloroplasten in belichteten Blättern reversibel ist, wenn die behandelten Objekte in Leitungswasser überführt und im Dunkeln aufbewahrt werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, in Richtung der von Lärz begonnenen Untersuchungen weiterzuarbeiten, um eine Methode in die Hand zu bekommen, die die Möglichkeit bietet, die Assimilationsfähigkeit einzelner Chloroplasten innerhalb einer Zelle zu prüfen. Läßt sich durch Plasmolyse — Lärz hat hier bereits die ersten Versuche unternommen — der Zuwachs der osmotischen Werte der Plastidenvakuolen mit der Zeit bei konstanter Belichtung verfolgen, dann dürfte damit die Möglichkeit gegeben sein, auch annähernd die Assimilationstüchtigkeit einzelner Chloroplasten quantitativ zu bestimmen.

B. Vakuolenbildung der Chloroplasten durch Alkaloide und Anaesthetica

I. Methodik

Als Versuchsmaterial dienten verschiedene Wasser- und Landpflanzen, die zum Teil aus den Gewächshäusern des Botanischen Gartens, zum Teil aus Freilandbeständen stammten. Bei vergleichenden Messungen würde größter Wert darauf gelegt, nur solches Pflanzenmaterial zu verwenden, das unter konstanten Bedingungen herangewachsen war und auch altersmäßig keine Unterschiede aufwies. *Helodea canadensis* und *Helodea densa* wurden eigens zu den Versuchen in besonderen Becken herangezogen.

Zu den Vakuolisationsversuchen wurden immer nur stärkefreie Blätter benutzt. Die Entstärkung erfolgte am schnellsten, wenn größere Sproßstücke verdunkelt wurden. Außerdem wurde durch die Verdunklung großer Sproßstücke vermieden, daß durch den Abbau der Assimilationsstärke eine Anhäufung des Zuckers in den Zellen stattfand, so daß keine Erhöhung der osmotischen Werte der Zellen auftreten konnte. Nach Angaben von Gahlen (1935) steigen nämlich beim Abbau der Stärke in den abgetrennten Blättern die osmotischen Werte während der Verdunklung stark an.

Für die Beurteilung des Lebenszustandes der Plastiden und der Zellen wurde in erster Linie die Plasmaströmung beobachtet. Daneben standen die Plasmolyse mit Traubenzucker oder KNO_3 sowie die Anfärbung mit Akridinorange (vgl. Strugger 1949) und Pyronin (vgl. Hanssen 1947) zur Analyse der Vitalität der Zellen zur Verfügung.

Als mikrochemischer Nachweis für die Aufnahme der Alkaloide wurde die Bouchardatsche Reaktion mit Jod-Jodkalium, einem Gruppenreagens auf Alkaloide, benutzt. Vorteilhaft war es, Jod-Jodkalium mit der V. I. M. zu infiltrieren, da sich bei einer schnellen und gleichmäßigen Behandlung mit diesem Reagens die sichersten Aussagen über die Aufnahme und Speicherung der Alkaloide machen ließen.

Bei den Untersuchungen, die Aufschluß darüber geben sollten, inwieweit die Chloroplasten, bei denen durch Alkaloide eine Vakuolenbildung hervorgerufen wurde, assimilationstüchtig bleiben, wurde die Winkler-Methode der O_2 -Bestimmung benutzt. Die Assimilationsmessungen erfolgten nach den Angaben von Alsterberg (1926), Gessner (1937) und Baumeister (1943). Die Assimilationsapparatur und die Versuchsflaschen mit seitlich angesetzten Ausbuchtungen wurden nach den Angaben von Baumeister (1945) angefertigt. Um individuelle Unterschiede der Pflanzen auszugleichen, wurden immer drei bis vier Sprosse, die gleich alt und gleich lang waren, belichtet. Die in den Kurven und Tabellen verzeichneten Werte sind in n/100 Natriumthiosulfat (kurz: Nath.) angeführt und auf je ein Gramm Frischgewicht, das am Ende eines jeden Versuches mit der Balkentorsionswaage ermittelt wurde, bezogen. Da der Vakuolisationsgrad der Chloroplasten parallel zur Belichtungszeit beobachtet werden sollte, wurden während des Versuches einzelne Blätter entfernt und mikroskopisch beobachtet. Bei den vergleichenden Messungen dürfte das gleichzeitige Entfernen einzelner Blätter von den Kontroll- und Versuchspflanzen kaum ins Gewicht fallen. Die Lichtstärke betrug in allen Versuchen mit der Winkler-Apparatur ungefähr 7500 Lux. Die Temperatur schwankte höchstens um 1°C .

II. Versuche mit Wasserpflanzen

1. Die Wirkung verschiedener Alkaloide auf die Chloroplasten von *Helodea canadensis*

Außer den Alkaloiden und Anaesthetica Cocain, Atropin, Novocain, Nikotin und Pantocain (Lärz 1942, Hanssen 1947) rufen auch Ephedrin (optimale Konzentration: 1:10 000 in Leitungswasser) Arecolin (1:1000), Scopolamin (1:1000), Physostigmin (1:2000), Pervitin (1:8000) und Larocain (1:5000) eine intravitale, progressive Vakuolenbildung hervor, wenn entstärkte Blätter von *Helodea* in den entsprechenden Lösungen belichtet werden. Sowohl in Ephedrin- wie auch in Arecolin-, Scopolamin- und Physostigminlösungen ließ sich die Vakuolenbildung mehrere Male hintereinander wiederholen, wenn einmal nach der Belichtung und Vakuolenbildung eine 24–48stündige Verdunklung in reinem Leitungswasser, während der die Chloroplasten wieder ein normales Aussehen erhielten, eingeschoben wurde und wenn man zweitens darauf achtete, daß nur Blätter benutzt wurden, deren Chloroplasten nicht zu stark gequollen waren.

Ganze Sprosse von *Helodea*, die in Arecolin belichtet wurden und deren Chloroplasten eine prächtige Vakuolenbildung zeigten, wuchsen nach 48stündiger Verdunklung in Leitungswasser kräftig weiter und zeigten

gegenüber den Kontrollen keine merklichen Unterschiede. Sie wuchsen nur kümmerlich weiter, wenn die Verdunklung unterblieb und die Sprosse sofort dem diffusen Tageslicht ausgesetzt wurden.

Am schönsten war die Vakuolenbildung in einer Physostigminlösung zu erzielen. Bei diesem Alkaloid konnten die Chloroplasten 4–6mal nach Rückgang der Vakuolen erneut zur Vakuolenbildung veranlaßt werden.

Der intravitale Vorgang der Plastidenvakuolisierung dürfte sich kaum besser beweisen lassen.

Eine Vakuolenbildung konnte dagegen trotz Anwendung verschiedener Konzentrationen und Pufferlösungen bei folgenden Stoffen nicht erzielt werden: Chinin, Papaverin, Percain, Strophantin, Strychnin, Sympatol, Oxychinolin, Adrenalin, Pilocarpin, Coffein, Theobromin, Curare und Nikotinsäure. Zählt man hierzu die Stoffe, bei denen bereits Lärz (1942) keine Wirkung erzielen konnte (Berberin, Brucin, Colchicin, Hydrastin, Morphin), und vergleicht sie mit den wirksamen, so dürfte sich daraus wohl folgendes ableiten lassen:

Weder die Molekülgröße noch die Permeabilität der Stoffe kann einen Einfluß auf das unterschiedliche Verhalten der Alkaloide bei der Vakuolenbildung ausüben, zumal fast sämtliche Alkaloide und Anaesthetica innerhalb kurzer Zeit in den Zellen nachweisbar waren. Auch aus der

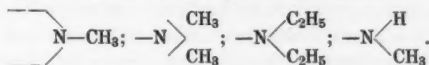


Abb. 1. *Sagittaria natans*. Blattabschnitt etwa 3 cm von der Spitze entfernt. Nachweis der Nikotinaufnahme nach 15 Minuten mit Jod-Jodkalium. Starke Speicherung in den Hauptnerven, keine in den Blattfeldern.

chemischen Zusammensetzung der untersuchten Stoffe läßt sich ohne weiteres ein Rückschluß auf ihre physiologische Wirkung nicht ziehen. Denn einmal kann das dreiwertige N-Atom, das allen wirksamen, aber auch einigen unwirksamen Stoffen gemeinsam ist, kaum eine entscheidende Rolle für das differenzierte Verhalten der untersuchten Chemikalien spielen, zum anderen ist ein Unterschied zwischen sekundären und tertiären Aminen ebenfalls nicht festzustellen.

Dagegen dürfte der molekularen Struktur, den lipophilen und hydrophilen Endgruppen, eine besondere Bedeutung beigemessen werden. So zeigen fast alle wirksamen Stoffe eine starke Affinität zu den Lipoiden. Das wird besonders gut sichtbar, wenn man die chemisch verwandten Stoffe Ephedrin und Pervitin (wirksam) mit Sympatol und Adrenalin (unwirk-

sam) vergleicht. Erstere besitzen die stark lipophile Phenylgruppe sowie die ebenfalls lipophile Methylgruppe; letztere zeichnen sich durch den Besitz der stark lipophoben Hydroxylgruppe aus. Eine besondere Bedeutung scheinen auch folgende Endgruppen zu haben:



2. Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Wasserpflanzen

Lärz (1942) vermutete, daß die bei den einzelnen Wasserpflanzen sehr unterschiedliche Vakuolenbildung der Chloroplasten entweder in einer

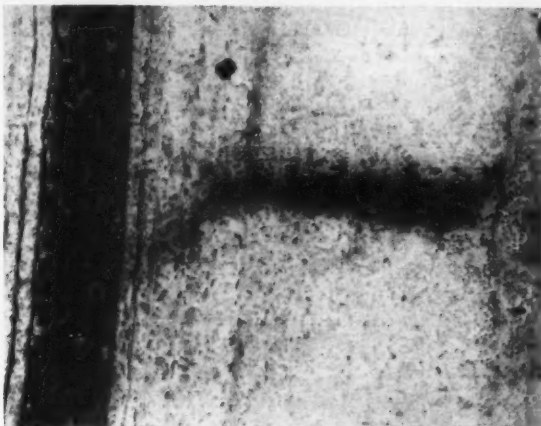


Abb. 2. *Sagittaria natans*. Blattabschnitt etwa 3 cm von der Spitze entfernt. Nachweis der Nikotinaufnahme nach 30 Minuten mit Jod-Jodkalium. Sehr starke Speicherung des Nikotins im Hauptnerv, starke im Quernerv, ganz geringe in den Blattfeldern.

individuell verschiedenen Speicherung der Alkaloide oder in einem unterschiedlichen Verhalten saccharophyller und amylophyller Pflanzen ihren Ursprung haben könnte. Zur Klärung dieser Frage wurden die Versuche auf eine Reihe von Wasserpflanzen ausgedehnt. Bei *Lemna trisulca*, *Lemna minor*, *Cabomba aquatica*, *Riccia fluitans*, *Sagittaria natans*, *Vallisneria spiralis*, *Vallisneria gigantea*, *Myriophyllum verticillatum*, *Helodea canadensis*, *Helodea densa* und *Helodea callitrichoides* setzte die Vakuolenbildung schon nach kürzester Belichtung in Nikotin- oder Physostigminlösungen ein. Bei *Hottonia palustris*, *Callitriche polymorpha*, *Ceratophyllum demersum* und bei *Utricularia neglecta* war eine Vakuolenbildung erst nach langer Belichtung zu erzielen.

Genauer wurde die Alkaloidaufnahme und -speicherung bei *Vallisneria* und *Sagittaria natans* analysiert. 8 cm lange Blattstücke von diesen Pflanzen wurden in eine Nikotinlösung (1:2000, p_H 7,12) gelegt und mit 10 000 Lux belichtet. Nach 15, 30 und 60 Minuten wurde die Aufnahme des

Nikotins mit Jod-Jodkalium geprüft. Es zeigte sich, daß die Alkaloide zunächst durch die Hauptnerven wandern und von den Zellen der Leitbündelscheide elektiv gespeichert werden. Von den Hauptnerven aus wandern sie durch die Quernerven in die Seitennerven, werden ebenfalls in den angrenzenden Zellen gespeichert und gelangen so erst sehr spät in die Blattfelder (vgl. Abb. 1 u. 2; sowie die Tab.). Man darf daher wohl annehmen, daß zumindest bei diesen beiden Pflanzen der unterschiedliche Vakuolisationsgrad innerhalb der einzelnen Blattbezirke auf einer zeitlich verschieden einsetzenden Speicherung beruht.

Wieweit nun durch saccharophylle oder amylophylle Pflanzen eine unterschiedliche Vakuolenbildung hervorgerufen wird, ist schwer zu entscheiden, da einmal extrem saccharophylle Wasserpflanzen nicht zur Verfügung standen, da zum anderen aber auch die Stärkepflanzen wohl primär Zucker bilden (vgl. Spoehr 1926, Rabinowitch 1945, Troll 1948, S. 391). Man darf daher wohl annehmen, daß das differenzierte Verhalten bei der Vakuolenbildung nicht durch ein abweichendes Verhalten saccharophyller und amylophyller Pflanzen bedingt ist, zumal vergleichende Untersuchungen bei *Utricularia*, *Cabomba*, *Sagittaria*, *Vallisneria* und *Helodea*, letztere rechnet Lärz nicht zu den extrem amylophyllen Pflanzen, erkennen ließen, daß die ersten kleinen Stärkekörner bei fast allen Pflanzen zur gleichen Zeit auftraten. Es ist aber aus anderen Gründen, auf die bei der Besprechung der Vakuolisationserscheinungen bei Landpflanzen noch näher eingegangen wird, zu vermuten, daß eine unterschiedliche Resistenz der Plastiden gegenüber den Alkaloiden entscheidend für die Ausbildung der Vakuolen ist.

3. Nachweis des Zuckers in den Plastidenvakuolen

Plasmolysiert man Blätter mit vakuolisierten Chloroplasten, so geht die Vakuolenbildung zurück. Bei vorsichtiger Deplasmolyse — als besonders günstiges Plasmolytikum erwies sich eine Lösung nach Brenner (1920) — treten die Vakuolen wieder in Erscheinung. Das Auftreten und Verschwinden der Chloroplastenvakuolen läßt auf einen osmotisch sehr wirksamen Stoff innerhalb der Chloroplasten schließen. Lärz (1942) konnte indirekt den Nachweis führen, daß der osmotisch wirksame Stoff während der Photosynthese gebildet wird. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß eine Anhäufung des Assimilationszuckers die Ursache für die Veränderung der Plastiden ist. Brauchbare mikrochemische Reaktionen, die einen genauen Aufschluß über die Lokalisation des Zuckers zulassen, gibt es nicht. Der Nachweis, daß der in den Chloroplasten wirksame Stoff aus Zuckern besteht, würde aber schon dann gegeben sein, wenn es gelingt, Zucker in der Nähe der Plastidenansammlungen nachzuweisen.

Die Reaktion mit α -Naphthol nach Molisch (1923), der Zuckernachweis mit Fehlingscher Lösung (Molisch 1923), die von A. Meyer (1885) abgeänderte Trommersche Probe und die Reaktion von Flückinger (nach Tunmann-Rosenthaler 1931) erwiesen sich für einen lokalisierten Zuckernachweis als unbrauchbar. Lediglich bei der etwas veränderten Osazonprobe nach Fischer (1890)-Senft (1904) ließ sich bis zu einem

gewissen Grade eine Aussage über die Verteilung des Zuckers innerhalb der Zellen machen.

In Vorversuchen, die nach den Angaben von Fischer-Senft (1904) und Mangham (1915) gemacht wurden, hatte sich herausgestellt, daß die Lokalisation der Osazone am besten gegeben war, wenn einmal die Präparate nicht erwärmt, sondern bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, wenn zum anderen zwei Teile reines Phenylhydrazin (Merck) mit einem Teil Natriumacetat (in Glycerin 1:10 gelöst) vermischt wurden. Die in diese Mischungen übertragenen Blätter zeigten dabei Osazonkristalle, die seltener aus Sphäriten, sondern in der Mehrzahl aus Büscheln, Sternen oder Einzelkristallen bestanden. Die Einzelkristalle hatten entweder nadel-förmige, wetzsteinförmige oder plattenförmige Gestalt. In reinem Alkohol

Entfernung der unter- suchten Abschnitte von der Basis der abge- schnittenen Blätter aus:	Ort und Stärke der Speicherung nach Minuten:											
	Hauptnerven			Quernerven			Blattfelder			Seitennerven		
	15	30	60	15	30	60	15	30	60	15	30	60
1 cm	++	+++	+++	+	+++	+++	+	++	+++	+	++	+++
2 cm	++	+++	+++	+	++	+++	-	+	+++	+	+	+++
3 cm	++	+++	+++	+	++	+++	0	-	++	-	+	+++
4 cm	++	+++	+++	-	++	+++	0	-	+	-	+	++
5 cm	++	+++	+++	0	+	+++	0	-	+	0	+	++
6 cm	++	+++	+++	-	++	+++	0	0	-	0	+	++
7 cm	++	+++	+++	-	++	+++	-	-	+	-	++	+++
Blattspitze	++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	++	+	++	+++

+++ sehr starke Speicherung - sehr schwache Speicherung
 ++ starke Speicherung 0 keine Speicherung
 + schwache Speicherung

wurden die Kristalle anfänglich kleiner und waren nach 24 bis 48 Stunden nicht mehr zu erkennen; dagegen blieben sie in Wasser, Salzsäure und Kalilauge erhalten. Eine Blaufärbung mit konzentrierter Schwefelsäure trat nie auf.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden stärkefreie Blätter von *Helodea canadensis* und *Helodea densa* in vier Versuchsreihen aufgeteilt:

1. Versuchsreihe. Eine Anzahl Blätter wurde in reines Leitungswasser übertragen und 3 Stunden unter dem Dunkelsturz aufbewahrt.

2. Versuchsreihe. Eine Anzahl Blätter wurde in Leitungswasser, dem Nikotin im Verhältnis 1:2000 zugesetzt wurde, übertragen und 3 Stunden unter dem Dunkelsturz aufbewahrt.

3. Versuchsreihe. Eine Anzahl Blätter wurde in reines Leitungswasser übertragen und mit 20 000 Lux bei Wärmeausschaltung belichtet. Nach 3 Stunden hatten sich in den Chloroplasten kleine Stärkekörner gebildet. In vielen Zellen war es zu Plastidensystrophen gekommen.

4. Versuchsreihe. Eine Anzahl Blätter wurde in Leitungswasser, dem Nikotin im Verhältnis 1:2000 zugesetzt war, übertragen und mit 20 000 Lux bei Wärmeausschaltung belichtet. Nach 3 Stunden hatten sich

in fast allen Zellen große Plastidenvakuolen gebildet. In vielen Zellen trat Brückenstellung der Chloroplasten ein.

Nach dieser dreistündigen Vorbehandlung wurden die Blätter in eine Mischung von 1 Tropfen Natriumacetat (in Glycerin 1:10 gelöst) mit 2 Tropfen reinem Phenylhydrazin übertragen und bei Zimmertemperatur beobachtet.

Ergebnisse aus Versuchsreihe 1 und 2. In den meisten Zellen bildeten sich zahlreiche Osazonkristalle; sie blieben aber im Verhältnis zu den anderen Versuchsreihen nur sehr klein und lagen in der Zelle verstreut. Eine unterschiedliche Verteilung innerhalb einer Zelle ließ sich nicht erkennen. Auffallend war, daß die kleinen, nadelförmigen Kristalle in einigen Zellen in größerer, in anderen Zellen nur in ganz geringer Anzahl auftraten. Am stärksten war die Anhäufung in der unmittelbaren Nähe der Leitbündelscheiden. Zwischen der Versuchsreihe 1 und 2 ließen sich keine Unterschiede feststellen.

Ergebnisse aus Versuchsreihe 3. Die ersten Osazone bildeten sich schon nach wenigen Stunden. Die Plastiden lagen in den meisten Fällen in Gruppen zusammen und zeigten infolge der Behandlung mit den Reagenzien typische Agglutinationsformen. Die Kristalle selbst lagen in den Zellen ziemlich verstreut, nur in einigen Fällen ließ sich eine leichte Beziehung zu den Plastidenanhäufungen erkennen. Eine Änderung der Kristallverteilung trat auch nach 24 Stunden nicht auf (siehe Abb. 3).

Ergebnisse aus Versuchsreihe 4. Die ersten Osazonkristalle bildeten sich ebenfalls schon nach wenigen Stunden. Die Plastiden waren zum großen Teil sehr stark agglutiniert; es ließ sich aber noch deutlich die Brückenstellung, die bei der Belichtung in Nikotin entstanden war, erkennen. Der weitaus größte Teil der Osazone trat in der Nähe dieser Plastidenansammlungen oder in diesen selbst auf. Nur ein geringer Teil lag außerhalb im Zellumen. Nach 24 Stunden hatten sich z. T. die Größe und die Anzahl der Osazone noch leicht erhöht. Eine Beziehung zu den Plastiden war auch jetzt noch festzustellen (siehe Abb. 4).

Als vorteilhaft bei diesen Untersuchungen erwies es sich, daß in den in Leitungswasser belichteten Blättern oft, wohl infolge der benutzten hohen Lichtintensitäten, Plastidensystrophien auftraten. In den Nikotinlösungen zeigten die Chloroplasten in vielen Fällen Brückenstellung. Infolge dieser Anhäufung der Chloroplasten ließ sich über die Lokalisation der Osazone eine bedeutend sicherere Aussage machen, da in diesem Falle ja nicht der Zucker in den einzelnen Plastiden, sondern die Zuckeranhäufung in der Nähe der Plastidenansammlungen nachzuweisen war.

Aus der Anhäufung der Osazone in der Nähe der Plastiden nach vorhergehender Belichtung in Nikotin darf man daher wohl mit ziemlicher Sicherheit den Schluß ziehen, daß der in den Plastidenvakuolen osmotisch wirksame Stoff aus Assimilationszucker besteht. Damit dürfte die Vermutung von Lärz (1942), die schon indirekt durch die Assimilationshemmung wahrscheinlich gemacht werden konnte, auch direkt ihre Bestätigung gefunden haben.

Die Brückenstellung der Chloroplasten bei *Helodea* während der Be-

handlung mit Nikotin beschreibt zuerst Herbst (1937). Er gibt an, daß das Nikotin in niederen Konzentrationsstufen die Chlorophyllkörner derart verlagert, daß sie sich als Brücke zwischen die Breitseiten der Zellen aufbauen und dort mehr oder weniger verklumpen. Nach Hanssen (1947) ist die Brückenstellung auf eine Wirkung des Alkaloids und nicht auf eine Lichtwirkung zurückzuführen.

Die von Herbst beobachtete Verklumpung der Plastiden ist vermutlich auf eine zu hohe Nikotinkonzentration zurückzuführen. Hanssen konnte

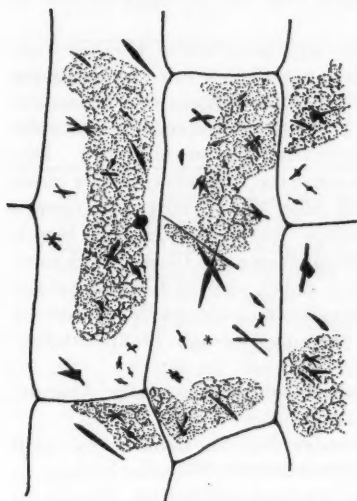


Abb. 3. *Helodea densa*. Zuckernachweis mittels Phenylhydrazin. Die Blätter wurden 3 Stunden in Leitungswasser mit 20 000 Lux belichtet. Die Osazonkristalle liegen verstreut in der Zelle. (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)



Abb. 4. *Helodea densa*. Zuckernachweis mittels Phenylhydrazin. Die Blätter wurden 3 Stunden in einer Nikotinlösung (1 : 2000) mit 20 000 Lux belichtet. Die Osazonkristalle zeigen eine deutliche Beziehung zu den Plastidenansammlungen. (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)

feststellen, daß in Nikotin (1 : 350, p_H 8,25) die Lebensdauer von *Helodea*-Blättern bei Belichtung 205 Minuten, bei Verdunklung 48 Stunden betrug. Die Vakuolenbildung erfolgte aber in einer Konzentration von 1 : 2000. Diese Verdünnung ist weit ungiftiger. Blätter, die in diesen Konzentrationen im Dunkeln aufbewahrt wurden, zeigten erst nach mehreren Tagen leichte Schäden. Die Brückenstellung der Plastiden trat aber bereits viel früher auf und wurde in vielen Fällen nach Übertragung der Blätter in Leitungswasser wieder abgebaut. Sie darf also nicht als Absterbeerscheinung aufgefaßt werden, sondern scheint vielmehr eine durch das Nikotin hervorgerufene, abgeänderte Form der Plasmasystrophe zu sein.

4. Osmotische Werte der Plastidenvakuolen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit

Durch die progressive Vakuolenbildung der Chloroplasten erhält man die Möglichkeit, die Assimilationstüchtigkeit einzelner Chloroplasten annähernd zu messen, wenn man voraussetzt, daß einmal die Assimilation der Chloroplasten durch die Alkaloide nicht allzu stark gehemmt oder gefördert wird, daß zum anderen sofort bei Beginn der Belichtung in den Alkaloiden der gebildete Assimilationszucker weder in kleinen Mengen durch die Plastidengrenzschicht diffundieren noch sich in den Plastiden zu Polysacchariden kondensieren kann.

Da zwischen den Zellinhaltskörpern ein osmotisches Gleichgewicht herrscht, muß sich auch bei der Plasmolyse von Zellen mit vakuolisierten Plastiden dieses Gleichgewicht zwischen der Konzentration der Zellen, der Chloroplastenvakuolen und der anderen Inhaltskörper einerseits sowie der Konzentration des Plasmolytikums andererseits wieder einstellen. Diejenige Außenkonzentration, bei der vakuolisierte Plastiden wieder ihren normalen Durchmesser erreicht haben, muß daher der jeweilig vorhandenen Innenkonzentration der Plastiden entsprechen. Auf diese Weise hat bereits Lärz (1942) die Abhängigkeit der osmotischen Werte der Plastidenvakuolen von der Belichtungszeit gemessen. Er fand dabei, daß in Cocainlösungen (1 : 5000) der osmotische Wert der Plastidenvakuolen während der Belichtung linear mit der Zeit bis zu einem Wert, der einer 1,2 mol. Traubenzuckerlösung entspricht, ansteigt.

Bei der Wiederholung der Versuche von Lärz wurden einige Abänderungen vorgenommen:

1. Statt Cocain wurde Physostigmin oder Nikotin benutzt, da nach Untersuchungen von Hanssen (1947) eine wiederholte Vakuolenbildung in Cocain erst nach völliger Auswaschung des Alkaloids möglich ist. Hanssen führt diese Erscheinung darauf zurück, daß das Cocain bei längerer Einwirkung einen assimilationshemmenden Einfluß ausübt.

2. Blätter, die untersucht werden sollten, wurden vor der Belichtung in Physostigmin- oder Nikotinlösungen zunächst im Dunkeln eine Stunde vorbehandelt, da sich herausstellte, daß in Blättern, die $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde in den Alkaloidlösungen im Dunkeln gelegen hatten, die Vakuolenbildung früher einsetzte als in unvorbehandelten Blättern. Verdunklungszeiten über eine Stunde zeigten keine Abweichungen mehr. Die schnellere Vakuolenbildung in vorbehandelten Blättern läßt sich vermutlich dadurch erklären, daß erst bei einer bestimmten Konzentration der Alkaloide innerhalb der Zelle eine optimale Vakuolenbildung stattfindet.

Daher wurden vorsichtig vom Sproß abgetrennte Blätter zunächst in eine Physostigminlösung (1 : 2000 in Leitungswasser, p_H 7,1–7,25; Temperatur 19–20° C) übertragen und eine Stunde lang unter dem Dunkelsturz aufbewahrt. Anschließend wurden die Blätter in derselben Lösung mit 20 000 Lux unter Ausschaltung der Wärmewirkung belichtet. Beobachtet wurden immer nur Zellen aus den Mittelabschnitten der Blattoberseite, da die Plastidenvakuolisierung in der Blattfläche, der Blattbasis, der Mittelrippe, der Blattspitze und in den Randzellen oft sehr unterschiedlich ver-

lief. Als Plasmolytikum wurde eine Traubenzuckerlösung in einer Konzentration von 0,35 Mol bis 1,3 Mol benutzt. Die Differenzen zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen betrugen jeweils 0,05 Mol. Um ein Auswaschen

Protokoll der Plasmolyserien VI, VII, VIII und IX
vom 16., 17., 18. und 19. 8. 1949.

Stärkefreie Blätter von *Helodea densa*, dicht unterhalb der Knospen.

Physostigmin 1 : 2000 in Leitungswasser, p_H 7,12.

Licht: 20 000 Lux.

Belichtungs- dauer in Minuten	Aussehen der Plastiden vor der Plasmolyse	Normale Plastiden bei...mol. Trauben- zucker
0	Normale Plastiden mit deutlicher Granastruktur	0,4
10	Ganz leichte Schwellung, verstärkte Granulierung	0,45
20	Deutliche Schwellung, Grana aufgelockert	0,5
30	Deutliche Streifung, Grana verschwunden	0,6
40	Starke Streifung, vereinzelt leichte Abhebung	0,7
50	Überall leichte Abhebung, deutliche Auflockerung des Stromas	0,8
60	Überall deutliche Abhebung, überall deutliche Vakuolenbildung	0,9
70	Überall deutliche Vakuolenbildung, Vakuolen fast so groß wie der normale Plastidendurchmesser. Plastiden erscheinen in der Seitenansicht fast rund.	1,0
80	Vakuolen so groß wie der normale Plastiden- durchmesser. Plastiden in der Seitenansicht rund.	1,05
95	Vakuolen zum Teil größer als der normale Pla- stidendurchmesser	1,1
115	Vakuolen mit $1\frac{1}{2}$ fachem Plastidendurchmesser	1,15
140	Vakuolen mit teilweise 2fachem Plastidendurch- messer	1,2
170	Keine Änderungen, einzelne Plastiden beginnen zu verkleben.	1,2

des Physostigmins während der Dauer des Plasmolyseversuches zu verhindern, wurden die Traubenzuckerkonzentrationen mit Physostigmin (1 : 2000) angesetzt. Die Blätter wurden von den niedrigeren Konzentrationsstufen jeweils in die nächsthöhere gebracht, bis eine Veränderung, d. h. eine Verkleinerung des kleineren Plastidendurchmessers nicht mehr zu beobachten war. Da die Plastiden oft einen unterschiedlichen Vakuolisationsgrad zeigten, wurde diejenige Konzentration als Grenzkonzentration angenommen, in der etwa 50% der Plastiden wieder einen normalen Durchmesser besaßen.

Es mag gleich vorweggenommen werden, daß es sich bei den angeführten Werten immer nur um Mittelwerte handeln kann, da es sehr schwierig war, die Konzentration zu ermitteln, bei der 50% der Plastiden wieder einen normalen Durchmesser besaßen. Schwierigkeiten ergaben sich auch bei der Plasmolyse mit Traubenzuckerkonzentrationen, die über 0,8 Mol lagen, da nur ein Teil der Zellen ohne Schädigungen nach zwei bis dreistündiger Versuchsdauer das Plasmolysieren überstand.

Die Versuchsergebnisse lassen sich am besten an Hand von Mittelwerten wiedergeben, die aus vier Versuchsreihen gewonnen wurden. Da bei etwa 0,35–0,4 mol. Traubenzucker Grenzplasmolyse auftrat, kann diese Konzentration als ursprünglicher osmotischer Wert der Plastiden angenommen werden (vgl. Protokoll S. 219).

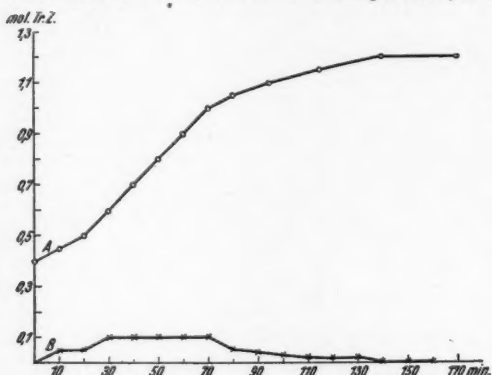


Abb. 5. *Helodea densa*. A. Der Zuwachs der osmotischen Werte der Plastidenvakuolen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Lichtstärke 20 000 Lux. B. Die Zunahme des osmotischen Wertes der Plastidenvakuolen pro Zeiteinheit.

tration als ursprünglicher osmotischer Wert der Plastiden angenommen werden (vgl. Protokoll S. 219).

Stellt man den osmotischen Zuwachs in Abhängigkeit von der Zeit in einer Kurve dar, so erhält man folgendes Bild (Abb. 5, Kurve A): Der osmotische Wert der Plastiden steigt in den ersten 20 Minuten langsam an. Danach erfolgt ein stärkerer linearer Anstieg bis zu einem osmotischen Wert, der etwa einer 0,9 bis 1,0 mol. Traubenzuckerlösung entspricht. Von

diesem Punkt an nahm der osmotische Wert nur noch langsam zu, bis er den Höchstwert von 1,2 Mol Traubenzucker erreichte. Der langsamere Anstieg der osmotischen Werte nach längerer Belichtung wird wahrscheinlich einmal darauf zurückzuführen sein, daß durch die starke Aufblätterung und Vakuolenbildung die Assimilation gehemmt wird; zum anderen dürfte aber auch die Zuckeranreicherung eine Assimilationshemmung bewirken.

In der Kurve B (Abb. 5) ist der Zuwachs der osmotischen Werte von 10 zu 10 Minuten errechnet. Die Kurve läßt besonders deutlich erkennen, daß die Zunahme des Assimilationszuckers bis zu einem Wert, der einer 1,0 mol. Traubenzuckerlösung entspricht, pro Zeiteinheit ziemlich konstant ist und nur bei Beginn der Belichtung und bei starker Vakuolisierung kleiner bleibt.

5. Bestimmung der Assimilationstüchtigkeit von Sprossen mit vakuolisierten Plastiden mittels der Winklermethode der O_2 -Bestimmung

Mit Hilfe der Gasblasenzählmethode konnte Treboux (1903) feststellen, daß stärkere Konzentrationen von Chinin, Morphin und Cocain die

Assimilation aufheben. Beim Herabgehen auf schwächere Konzentrationen nahm die schädigende Wirkung allmählich ab und unterblieb schließlich ganz, wenn die Konzentration den Grenzwert der Giftigkeit erreichte, ging aber nie in eine beschleunigte Assimilation über. Die Ursache der Assimilationshemmung glaubt Treboux in einer allgemeinen Schädigung der Zelle suchen zu müssen.

Um nun einen genauen Aufschluß darüber zu erhalten, ob mit der Vakuolenbildung in den Chloroplasten von *Helodea*-Sprossen ein Abfall der Photosynthese verbunden ist, wurden Untersuchungen mit der Winklermethode der O_2 -Bestimmung durchgeführt. Vorversuche mit *Helodea canadensis* und *Helodea densa* in O_2 -erniedrigtem Wasser ergaben, daß zwischen gleichaltrigen und gleich großen Sprossen derselben Kultur nur geringe Unterschiede in der Assimilation auftraten, so daß sich vergleichende Messungen ohne Bedenken durchführen ließen. Als Beispiel sei der Vorversuch III mit *Helodea canadensis* angegeben:

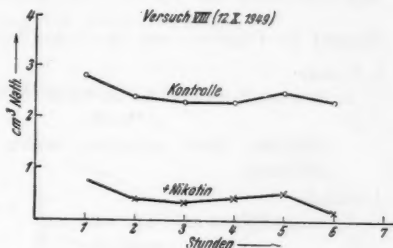


Abb. 6. *Helodea canadensis*. Versuch VIII vom 12. 10. 1949.

Protokoll der Assimilationsbestimmung nach Winkler. Vorversuch III vom 18. 9. 1949. Belichtungsbeginn: 9.00 Uhr.

Helodea canadensis, stärkefrei.

Lichtstärke: 7500 Lux.

I. Versuchsreihe.

4 Sprosse mit je 22 Blattquirlen, Frischgewicht: 1,576 g.

O_2 -Gehalt des Versuchswassers: 6,27/100 Natriumthiosulfat je 200 cm³.

II. Versuchsreihe.

4 Sprosse mit je 22 Blattquirlen, Frischgewicht: 1,420 g.

O_2 -Gehalt des Versuchswassers: 6,27/100 Nath./200 cm³.

Sauerstoffzuwachs pro Stunde je g Frischgewicht:

1. Stunde: I: 3,22/100 Nath.	II: 3,14/100 Nath.
2. Stunde: I: 2,81/100 Nath.	II: 2,92/100 Nath.
3. Stunde: I: 2,55/100 Nath.	II: 2,71/100 Nath.
4. Stunde: I: 3,06/100 Nath.	II: 2,87/100 Nath.
5. Stunde: I: 2,84/100 Nath.	II: 2,76/100 Nath.

Auf Grund dieser Vorversuche ließen sich vergleichende Messungen ohne Bedenken durchführen. Die ersten Versuche mit Alkaloiden zeigten aber, daß die Assimilation der Sprosse, die in Physostigmin- oder Nikotinlösungen (1 : 2000 in O_2 -erniedrigtem Leitungswasser) belichtet wurden, bedeutend geringer zu sein schien als die der Kontrollen in reinem Leitungswasser. Die Versuchsergebnisse seien an Hand eines Protokolls und einer Kurve (Abb. 6) dargestellt.

Protokoll der Assimilationsbestimmung nach Winkler, Versuch VIII
vom 12. 10. 1949. Belichtungsbeginn: 15.00 Uhr.

Helodea canadensis, stärkefrei.

Lichtstärke: 7500 Lux.

Temperatur: 19,5° C.

I. Versuchsreihe, Kontrolle.

4 Sprosse mit je 25 Blattquirlen, Gewicht: 1,426 g.

O₂-Gehalt des Versuchswassers: 5,85/100 Nath./200 cm³.

II. Versuchsreihe, Versuch mit Nikotin (1:2000).

4 Sprosse mit je 25 Blattquirlen, Gewicht: 1,432 g.

O₂-Gehalt des Versuchswassers: 4,92/100 Nath./200 cm³.

Zustand der Plastiden und stündlicher Sauerstoffzuwachs je 1 g Frischgewicht:

1. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,8/100 Nath.

II: " 0,75/100 "

Plastiden leicht gequollen, leichte Streifung, deutlich sichtbare Plasmaströmung.

2. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,41/100 Nath.

II: " 0,40/100 "

Plastiden stärker gequollen, vereinzelt leichte Abhebung der Plastidenmembran.

3. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,54/100 Nath.

II: " 0,37/100 "

Plastiden stark gequollen, deutliche Abhebung.

4. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,55/100 Nath.

II: " 0,48/100 "

Alle Chloroplasten zeigen leichte, aber deutliche Vakuolenbildung. Plasmaströmung noch sichtbar.

5. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,51/100 Nath.

II: " 0,52/100 "

Plastidenvakuolen etwa $\frac{1}{2}$ so groß wie der normale Plastidendurchmesser.

6. Stunde:

I: Sauerstoffzuwachs 2,54/100 Nath.

II: " 0,19/100 "

Vakuolendurchmesser etwa so groß wie der normale Plastidendurchmesser. Plastiden dem Rundlichen genähert.

Deutlicher werden die Ergebnisse, wenn die Werte des abgegebenen Sauerstoffes in einer Kurve dargestellt werden (Abb. 6).

Bei diesen ersten Assimilationsmessungen liegen also bei den Sprossen, die in Alkaloidlösungen assimilierten, die Werte der O₂-Abgabe bedeutend niedriger als bei den Kontrollen. Bei einigen Messungen traten sogar negative Werte auf, d. h. der Sauerstoffgehalt des alkaloidhaltigen Wassers lag vor der Belichtung höher als nachher. Es lag daher die Vermutung nahe,

daß Oxydationsprozesse der Alkaloide die Assimilationsmessungen sehr stark beeinflussen würden, vor allem dann, wenn ihnen der Sauerstoff sozusagen in statu nascendi geboten wurde. Darauf deuteten einmal die negativen Werte sowie die leichte Rotfärbung der Physostigminlösung und die leichte Braunfärbung der Nikotinlösung während der Assimilation hin. Auch die Tatsache, daß der O_2 -Gehalt des Wassers der Kontrollflasche vor Beginn des Versuchs höher lag als der des alkaloidhaltigen Wassers, obgleich Kontroll- und Versuchsflasche vorher mit demselben O_2 -erniedrigten Wasser gefüllt worden waren, ließ auf Oxydationsprozesse der Alkaloide während der Assimilation schließen. Der gleichsinnige Verlauf der Kontroll- und Alkaloidkurve war nur eine Bestätigung für diese Annahme.

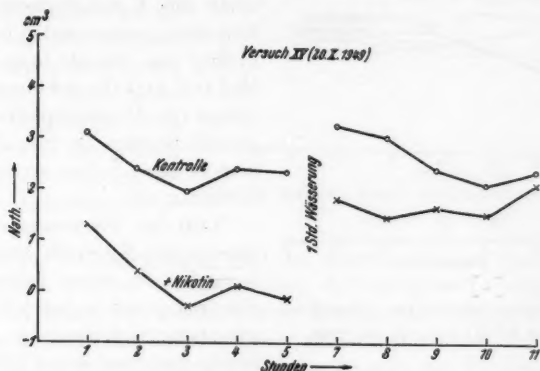


Abb. 7. *Helodea canadensis*. Assimilationsversuch XV vom 20. 10. 1949.

War diese Vermutung richtig, dann mußten die Unterschiede im Sauerstoffgehalt zwischen dem Wasser der Kontroll- und Versuchspflanzen geringer werden, wenn die Versuchssprosse nach der Belichtung in alkaloidhaltigen Lösungen in reinem Leitungswasser weiterbelichtet wurden. Die folgenden Versuche wurden daher so angestellt, daß die Versuchssprosse zunächst mehrere Stunden in alkaloidhaltigem, sauerstofferniedrigtem Wasser belichtet wurden, bis sich in allen Blättern eine deutliche Vakuolenbildung zeigte. Nach der Unterbrechung und einer zweistündigen Wässerung im Dunkeln wurden die Kontroll- und die Versuchssprosse in reinem, sauerstofferniedrigtem Wasser weiter untersucht. Als Beispiel sei aus dieser Versuchsserie der Versuch XV angeführt.

Protokoll der Assimilationsbestimmung nach Winkler, Versuch XV
vom 20. 10. 1949. Belichtungsbeginn: 9.00 Uhr.

Helodea canadensis, stärkefrei.

Lichtstärke: 7500 Lux.

Temperatur: 20° C.

1. Kontrolle.

4 Sprosse mit je 27 Blattquirnen, Frischgewicht: 1,835 g.

O_2 -Gehalt des Versuchswassers: 5,21/100 Nath./200 cm³.

II. Versuch. Nikotinlösung (1:2000).

4 Sprosse mit je 27 Blattquirle, Frischgewicht 1,829 g.
 O_2 -Gehalt des Versuchswassers: 4,98/100 Nath./200 cm³.

Die gemessenen Assimilationswerte sind in Abb. 7 wiedergegeben.

In den ersten 5 Stunden war zwischen der Kontrolle und dem Versuch mit Nikotin ein deutlicher Unterschied im O_2 -Gehalt des Versuchswassers festzustellen. Beide Kurven verliefen aber wiederum gleichsinnig. Die Plastiden waren nach 5 Stunden in der Nikotinlösung stark gequollen und

zeigten deutlich Vakuolen. Der Versuch wurde jetzt unterbrochen, sowohl die Kontrollsprosse wie die Versuchssprosse wurden im Dunkeln kräftig eine Stunde lang gewässert. Mit Jod-Jodkalium konnte eine Abnahme der Alkaloidspeicherung festgestellt werden, es trat aber immer noch in allen Zellen ein starker Niederschlag auf.

Nach der Wässerung wurden die Sprosse der Kontrolle sowie die des Versuches in reines Leitungswasser übertragen und in der Assimilationsapparatur weiterbelichtet. Die Differenz zwischen dem O_2 -Gehalt der

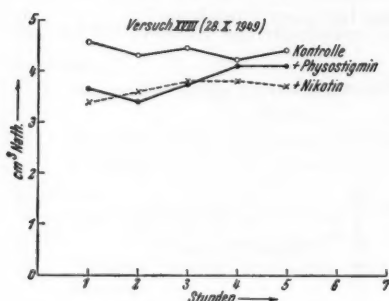


Abb. 8. *Helodea canadensis*. Assimilationsversuch XVIII vom 28. 10. 1949.

Kontroll- und der Versuchsflaschen war nach der Wässerung längst nicht mehr so auffallend wie vor der Wässerung (siehe Abb. 7) und wurde in den nächsten Stunden eher noch geringer als größer, obgleich die Plastiden-vakuolen am Ende des Versuches noch deutlich zu erkennen waren.

Ganz ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch, wenn Sprosse von *Helodea canadensis* oder *Helodea densa* zunächst außerhalb der Assimilationsapparatur in Nikotin- oder Physostigminlösungen vorbelichtet wurden. Als Beispiel sei der Versuch XVIII angeführt.

Protokoll der Assimilationsbestimmung nach Winkler, Versuch XVIII
 vom 28. 10. 1949.

Je vier Sprosse von *Helodea canadensis* (stärkefrei) wurden getrennt in einer Nikotinlösung (1:2000), einer Physostigminlösung (1:2000) und in reinem Leitungswasser mit 15 000 Lux 2 Stunden lang belichtet, bis die Sprosse, die in den Alkaloidlösungen lagen, eine deutliche Plastidenvakuolisierung aufwiesen. Alle Sprosse wurden daraufhin 2 Stunden im Dunkeln gewässert. Jod-Jodkalium rief einen etwas geringeren Niederschlag als vor der Wässerung hervor; Vakuolenbildung war aber noch deutlich zu erkennen. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Sprosse auf ihre Assimilation geprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 angeführt.

Es zeigte sich in diesem Versuch, wie aus Abb. 8 hervorgeht, daß die Assimilationswerte der in den Alkaloiden vorbehandelten Sprosse zwar

nicht so hoch lagen wie die Werte der Kontrolle, daß aber trotz der Vakuolisierung der Chloroplasten längst nicht der Unterschied vorhanden war, wie er in den ersten Versuchen (vgl. Abb. 6) auftrat, wenn die Assimilation der Sprosse in den Alkaloidlösungen gemessen wurde.

Aus allen diesen Versuchen kann man wohl mit Recht schließen, daß die ersten Resultate mit der viel geringeren Sauerstoffausscheidung der in den Alkaloidlösungen belichteten Sprosse zumindest nicht in ihrem ganzen Umfang auf eine Assimilationshemmung durch Nikotin oder Physostigmin zurückzuführen sind. Ob überhaupt eine Hemmung der Assimilation erfolgt, ist auf Grund der durchgeführten Versuche mit Nikotin oder Physostigmin nicht zu sagen, da ihre Oxydation eine genaue Bestimmung des von den Pflanzen ausgeschiedenen Sauerstoffes nicht zuläßt. Wenn trotzdem im folgenden noch einige Versuche beschrieben werden, dann nur, um etwaige Vergleichswerte zu erhalten.



Abb. 9. *Helodea densa*. Assimilationsversuch XXVI vom 5. 11. 1949.

Die letzten Untersuchungen über die Assimilation von Sprossen in Alkaloidlösungen wurden so durchgeführt, daß nur noch Leitungswasser benutzt wurde, dessen O_2 -Spannung nicht herabgesetzt worden war. Die Alkaloidlösungen und das Kontrollwasser wurden so lange an der Luft stehen gelassen, bis die Nikotinlösung eine leicht braune, die Physostigminlösung eine helle weinrote Färbung annahmen. In diesen Lösungen wurde die Assimilationstüchtigkeit der Sprosse bestimmt. Durch die Verwendung der Versuchsflaschen mit den seitlich angesetzten Ausbuchtungen (nach Baummeister 1943) konnte die Bestimmung des gasförmig ausgeschiedenen Sauerstoffes ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen seien an Hand des Versuches XXVI erläutert.

Protokoll der Assimilationsbestimmung nach Winkler, Versuch XXVI
vom 5. 11. 1949. Belichtungsbeginn 15.00 Uhr.

Helodea densa, stärkefrei.

Lichtstärke: 7500 Lux.

Temperatur: 21,5° C.

O_2 -Gehalt des Versuchswassers wurde stündlich neu bestimmt.

I. Versuchsreihe. Kontrolle in Leitungswasser.

3 Sprosse mit je 20 Blattquirlen, Gewicht 1,86 g.

II. Versuchsreihe. Versuch mit Nikotin (1:2000).

3 Sprosse mit je 20 Blattquirlen, Gewicht: 1,73 g.

Zustand der Plastiden nach der:

1. Stunde: Leichte Streifung in der Seitenansicht. Auflockerung der Granastuktur. Plasmaströmung lebhaft.

Protoplasma, Bd. XL/2.

2. Stunde: Überall leichte Abhebung. Plastiden z. T. leicht zerklüftet. Plasmaströmung wieder langsamer.
3. Stunde: Überall deutlich einsetzende Vakuolisierung der Plastiden.
4. Stunde: Deutliche Vakuolisierung. Stärkere Zerklüftung der Plastiden.
5. Stunde: Stärkere Vakuolenbildung. Plastidendurchmesser in der Seitenansicht etwa doppelt so groß wie der normale. Teilweise Brückenstellung der Plastiden. Osmotischer Wert der Plastidenvakuolen entspricht ungefähr einer 0,95 mol. Traubenzuckerlösung.
6. Stunde: Vakuolisierung weiter fortgeschritten. Plastiden stark zerklüftet.
7. Stunde: Höchstmaß der Vakuolisierung erreicht.
8. Stunde: Keine Änderungen. Alle Zellen lassen sich plasmolysieren.

Die Assimilationswerte lassen sich am besten an Hand einer Kurve darstellen (Abb. 9).

Bei dieser Versuchsanordnung zeigte es sich, daß der Assimilationsunterschied zwischen den Sprossen der Kontrolle und den Sprossen in Nikotin oder Physostigmin nicht allzu groß war. Nach etwa fünfstündiger Belichtung setzte dann ein deutlicher Abfall der Alkaloidkurve ein. Vergleicht man die Kurve mit dem Zustand der Plastiden, so kann man feststellen, daß dieser Abfall beginnt, wenn der Plastidendurchmesser etwa auf das Doppelte vergrößert ist und der osmotische Wert der Plastidenvakuolen etwa dem Wert einer 0,9—1,0 mol. Traubenzuckerlösung entspricht. Andere Versuche zeigten ähnliche Ergebnisse; vereinzelt traten auch Abweichungen auf.

Vergleicht man die Assimilationswerte der Nikotinkurve aus Abb. 9 mit dem Anstieg der osmotischen Werte der Plastidenvakuolen mit der Zeit aus Abb. 5, so ergibt sich eine auffallende Ähnlichkeit zwischen beiden Kurven. Die Assimilationswerte, einmal in mol. Traubenzucker und einmal in $n/100$ Nath. ausgedrückt, bleiben bei beiden Kurven anfänglich ziemlich konstant im Verhältnis zur Zeiteinheit. Erst bei stärkerer Vakuolisierung, bei einem osmotischen Wert von 0,9—1,0 mol. Traubenzucker, ist in beiden Kurven ein deutlicher Abfall der Photosynthese zu erkennen. Der Unterschied in den beiden Kurven liegt nur darin, daß einmal bei stärkerer Lichtintensität die Vakuolenbildung früher (Abb. 5), bei schwächeren Lichtintensitäten hingegen später einsetzt (Abb. 9).

Vergleicht man nun in Abb. 9 die Kontrollkurve mit der Nikotinkurve, vergleicht man zum anderen die Nikotinkurve aus Abb. 9 mit der Kurve der osmotischen Werte der Plastidenvakuolen in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 5) und zieht außerdem noch die Untersuchungen über den Zuckernachweis der Plastidenvakuolen zu Vergleichen heran, so darf man wohl folgende Schlüsse ziehen:

1. Die progressive Vakuolenbildung der Chloroplasten in verschiedenen Alkaloiden während der Belichtung wird durch eine Ansammlung des Assimilationszuckers in den Chloroplasten verursacht.
2. Die osmotischen Werte der Plastidenvakuolen wachsen anfänglich linear mit der Belichtung an. Eine starke Assimilationshemmung wird zu Beginn der Belichtung durch die Aufblätterung der Plastiden mit großer Wahrscheinlichkeit nicht hervorgerufen.

3. Die Vakuolenbildung der Chloroplasten von *Helodea* in Alkaloiden bietet die Möglichkeit, die Assimilationsfähigkeit einzelner Chloroplasten zu prüfen. Denn einmal steigen die osmotischen Werte, die durch den Assimilationszucker bedingt sind, mit der Zeit an. Zum anderen findet trotz der Anwesenheit der Alkaloide eine Assimilation statt, zumindest wird sie nicht allzu stark gehemmt.

4. Eine exakte, quantitative Assimilationsmessung ist auf Grund der Vakuolenbildung der Chloroplasten noch nicht möglich.

III. Versuche mit Landpflanzen.

Bisher sind nur Wasserpflanzen zu Untersuchungen über die Vakuolenbildung der Plastiden durch Alkaloide herangezogen worden. Bei den Landpflanzen ist die Untersuchung insofern erschwert, weil hier die Alkaloide den Blattorganen durch den Transpirationsstrom zugeführt werden müssen. Da aber die Alkaloide und Anaesthetica nur im alkalischen Bereich vom Cytoplasma und von den Vakuolen gespeichert werden und Plastidenvakuolen hervorrufen (vgl. Lärz 1942, Hanssen 1947), ist die Wandergeschwindigkeit stark begrenzt, zumal, wie Hanssen nachwies, die Alkaloide in großen Mengen von den Zellen gespeichert werden.

Wie schon die Versuche mit *Vallisneria* und *Sagittaria natans* zeigten, gelangen die Alkaloide erst sehr spät in die Blattfelder, da ihre Speicherung in den Leitbündelscheiden die Ausbreitung sehr stark verzögert. Noch ausgeprägter als bei *Vallisneria* und *Sagittaria natans* machte sich diese langsame Wanderung der Alkaloide bei Landpflanzen bemerkbar. Wurden z. B. Blätter von *Sagittaria subulata*, *Canna flaccida*, *Sagittaria sagittifolia*, *Chrysanthemum Indicum*, *Primula Sinensis*, *Allium*, *Iris* und *Yucca*, die eine optimale Transpiration zeigten, in Nikotin- oder Physostigminlösungen gestellt und belichtet, so war selbst nach vielstündiger Belichtung eine Vakuolenbildung nicht zu erzielen. Lediglich in den Blattstielen und in der Basis der Blattfläche traten vereinzelt vakuolisierte Chloroplasten auf. Die Alkaloide waren auch nach Stunden nicht in den Blattspreiten nachweisbar. Nur in den Leitbündelscheiden trat mit Jod-Jodkalium ein Niederschlag auf. Die Versuche bestätigten, daß einmal die Alkaloide bei ihrer Ausbreitung in pflanzlichen Geweben sich so verhalten, wie dies von basischen Farbstoffen immer wieder beobachtet werden konnte (vgl. Strugger 1935, 1949; Drawert 1939, 1940), und daß zum anderen die Wandergeschwindigkeit mit dem Transpirationsstrom zu langsam erfolgte, um, wenn überhaupt, vor Beginn der Stärkebildung in die Blattflächen zu gelangen.

Wurden stärkefreie Blattstücke mit einer Alkaloidlösung infiltriert und in derselben Lösung belichtet, so war eine Vakuolenbildung nicht zu erzielen, obgleich in fast allen Zellen eine gleichmäßig starke Alkaloidspeicherung festzustellen war. Daß trotzdem die Vakuolenbildung unterblieb, lag daran, daß die Photosynthese untergetauchter Blätter von Landpflanzen unterbunden oder zumindest sehr stark gehemmt wird (vgl. Nagamatz 1888, Willstätter und Stoll 1918, Gessner 1940 und Popoff 1941).

Bei Blattstücken von *Sagittaria subulata*, *Sagittaria sagittifolia*, *Primula Sinensis*, *Chrysanthemum Indicum* und *Allium moly*, die ohne Infiltration

in eine Alkaloidlösung gelegt und belichtet wurden, bildeten sich in den Randpartien der Blattstücke, die auf den Lösungen schwammen, intravitale Chloroplastenvakuolen. Die Vakuolenbildung ging aber zur Mitte der Blattstücke immer mehr zurück. Diese nach innen abklingende Vakuolenbildung entsprach völlig der Alkaloidaufnahme und -speicherung, die ebenfalls einen starken Gradienten von den Rändern zur Mitte hin aufwies.

Bei den Versuchen mit Blattstücken traten aber verschiedentlich in den Stomatazellen vakuolisierte Plastiden auf. Es wurden daher Epidermishäutchen von der Blattunterseite von *Tradescantia Virginica* vorsichtig abgezogen, mit der Unterseite auf eine Nikotinlösung (1:2000) gelegt, ohne



Abb. 10. *Rhoeo discolor*. Spaltöffnung mit vakuolisierten Plastiden. Nach dreistündiger Belichtung mit 15 000 Lux in einer Physostigminlösung (1:2000 in Leitungswasser).

dabei die Oberseite zu benetzen. Nach einer halbstündigen Verdunklungszeit zeigten alle Zellen, vor allem die Schließzellen, eine starke Nikotinspeicherung. Bei der Belichtung mit 10 000 Lux traten nach anfänglicher Quellung — die Stärkekörner wurden dabei kleiner — deutlich sichtbare Chloroplastenvakuolen auf. In den Dunkelkontrollen (Nikotin und Leitungswasser) sowie in den in Wasser belichteten Epidermishäutchen trat eine Vakuolenbildung auch nicht andeutungsweise auf. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei *Rhoeo discolor* (Abb. 10). Ebenso ließ sich in den

Stomatazellen von *Antirrhinum maius*, *Centaurea montana*, *Calendula officinalis*, *Dracaena latifolia*, *Oenothera biennis* und *Helidrysum monstrosum* eine progressive Vakuolenbildung bei gleichzeitigem Abbau der Schließzellenstärke beobachten. Übertrug man Epidermishäutchen mit vakuolisierten Plastiden in Leitungswasser, so ging die Vakuolenbildung im Dunkeln zurück, dabei vergrößerten sich wiederum die Stärkekörner in den Schließzellen. Die Stomatazellen erwiesen sich gegenüber den Alkaloiden als sehr widerstandsfähig und blieben selbst nach Tagen noch am Leben, wenn die Epidermiszellen bereits tot waren, obgleich in ihnen die Alkaloidspeicherung am stärksten auftrat. Schon aus diesem Grunde dürfte es sich bei der Vakuolenbildung nicht um eine Absterbeerscheinung handeln.

Am günstigsten ließ sich eine Vakuolenbildung der Chloroplasten bei Landpflanzen erzielen, wenn Flächenschnitte von der Unterseite der Blätter hergestellt und auf einer Alkaloidlösung schwimmend belichtet wurden. Blätter, die untersucht werden sollten, wurden vorher an den Pflanzen verdunkelt, bis außer in den Schließzellen keine Stärke mehr festzustellen war. Die Beobachtung der Vakuolenbildung erfolgte im allgemeinen von der Epidermis her, weil so die am wenigsten geschädigten oder durch Wundreiz beeinflussten Zellen beobachtet werden konnten.

Stärkefreie Flächenschnitte von *Centaurea montana* zeigten, nachdem sie

eine halbe Stunde im Dunkeln auf einer Nikotinlösung (1 : 2000) geschwommen hatten, in allen Zellen eine starke Speicherung des Alkaloids. Die enorme Anhäufung des rotbraunen Niederschlages (Jod-Jodkalium-Reaktion) in den Basiszellen der Haare dürfte sich wohl dadurch erklären lassen, daß es sich hier um Orte gesteigerter kutikulärer Transpiration handelt (vgl. Strügger 1958, 1959 a und b).

Wurden diese vorbehandelten Schnitte in derselben Lösung belichtet, so zeigten sich folgende Ergebnisse:

In den Schließzellen quollen die Chloroplasten zunächst auf, dabei wichen die

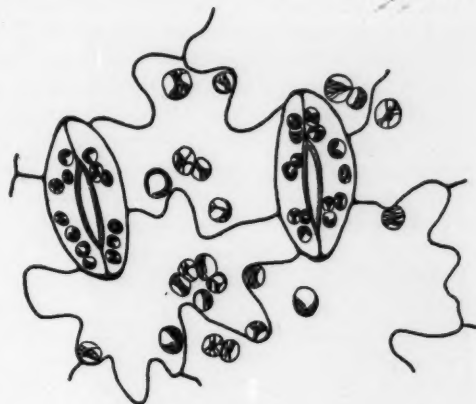


Abb. 11. *Centaurea montana*. Vakuolenbildung in der Epidermis nach dreistündiger Belichtung mit 10 000 Lux in Nikotin (1 : 2000). (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)



Abb. 12. *Centaurea montana*. Vakuolenbildung im Mesophyll. Nach vierstündiger Belichtung mit 10 000 Lux in Nikotin (1 : 2000). Auffallend ist der starke Unterschied im Vakuolisationsgrad der Plastiden. (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)

Stärkekörner auseinander; zwischen ihnen traten hellere Streifen auf, die nach und nach größer wurden. Nach 2 Stunden war eine deutliche Vakuolenbildung zu erkennen (Abb. 11).

In der Epidermis wurden die Chloroplasten in der Seitenansicht anfänglich streifig und bildeten nach einer Stunde kleine Vakuolen. Nach längerer Belichtung nahm die Größe der Vakuolen noch beträchtlich zu (Abb. 11).

Im Mesophyll quollen die Chloroplasten zunächst auf und verloren dabei ihre Granastruktur. Nach längerer Belichtung war in allen lebenden Zellen eine starke Vakuolenbildung zu erkennen. Bemerkenswert war der oft erhebliche Unterschied im Vakuolisationsgrad zwischen den einzelnen Chloroplasten einer Zelle (Abb. 12). Im Dunkeln ging die Vakuolenbildung zurück, wenn die Schnitte in Leitungswasser übertragen wurden. Eine erneute Vakuolenbildung war möglich.

Besonders gut war die Vakuolenbil-

dung bei *Chrysanthemum Indicum* (Abb. 13) und bei *Primula Sinensis* (Abb. 14) zu beobachten. Die Vakuolenbildung setzte zuerst in der Epidermis, dann in den Spaltöffnungen und zuletzt im Mesophyll ein. Während in der Epidermis die Vakuolenbildung bald ihren Höhepunkt überschritten hatte, ging sie im Mesophyll noch weiter. Auffallend war auch bei diesen Pflanzen der oft sehr unterschiedliche Vakuolisationsgrad der einzelnen Chloroplasten innerhalb einer Zelle. Bei Übertragung der Versuchsschnitte in Leitungswasser ging während der Verdunklung die Vakuolenbildung am schnellsten in den Stomatazellen, dann in der Epidermis und zuletzt im Mesophyll zurück. Nach 24–48 Stunden waren fast alle Chloroplasten wieder normal.



Abb. 13. *Chrysanthemum Indicum*. Vakuolenbildung im Mesophyll nach dreistündiger Belichtung mit 20 000 Lux in Physostigmin (1 : 2000).

Ganz ähnliche Ergebnisse wie bei *Centaurea* und bei *Primula* ließen sich auch bei *Calendula officinalis*, *Helichrysum monstrosum*, *Rudbeckia hirta*, *Yucca arborescens*, *Lilium candidum* (Abb. 15) und bei *Pelargonium zonale* erzielen. Während bei den vorher genannten Pflanzen die Vakuolenbildung bereits nach 1–2 Stunden deutlich sichtbar wurde, trat sie bei *Aquilegia vulgaris*, *Dianthus imperialis*, *Tinantia fugax* und bei *Tigridia pavonia* erst nach drei- bis vierstündiger Belichtung auf und erreichte auch nie

das Ausmaß wie bei ersteren Pflanzen. Bei *Canna discolor*, *Iris Pseudacorus* und *Iris graminea* setzte die Vakuolenbildung mit noch größerer Verzögerung ein und entstand zuerst in den langgestreckten Zellen, die die Leitbahnen umgaben. Das verzögerte Einsetzen der Vakuolenbildung war nicht begründet in einer unterschiedlichen Alkaloidspeicherung, sondern dürfte vielmehr darin zu suchen sein, daß die Chloroplasten der verschiedenen Pflanzen eine sehr unterschiedliche Konsistenz besitzen.

Bei *Antirrhinum maius* trat in einigen Fällen eine klar erkennbare Vakuolenbildung ein, in anderen Fällen ließ sich überhaupt keine Vakuolenbildung erzielen, in wieder anderen Fällen bildeten sich in einigen Zellkomplexen Vakuolen, in anderen nicht. Alle diese Abweichungen und Eigenarten bedürfen noch der näheren Analyse.

Während bei *Iris pumila* und *Iris pallida* die Plastiden der Schließzellen bereits nach 2 Stunden Vakuolen aufwiesen, konnte im Mesophyll erst nach 24stündiger Belichtung eine Vakuolenbildung hervorgerufen werden. Bei *Iris Germanica* war auch nach 48stündiger Belichtung weder in den Schließzellen noch im Mesophyll Chloroplastenvakuolisierung zu erzielen.

Eine etwas abweichende Plastidenvakuolisierung zeigte *Nicotiana affinis*. Im Gegensatz zu den Spaltöffnungen, in denen nur nach längerer Belich-

tung eine Vakuolenbildung eintrat, entstand schon nach kurzer Belichtung im Mesophyll eine prächtige Vakuolenbildung (Abb. 16). Das Stroma blieb in vielen Fällen randständig liegen. Auffallend war, daß die Granstruktur bei der Vakuolisierung sehr lange erhalten blieb. Sowohl bei stärkerer Vakuolenbildung wie auch vor allem anfänglich bei der Aufquellung der Chloroplasten ließen sich sehr schön in der Seitenansicht die geldrollenförmig übereinanderliegenden Grana erkennen, wie es Strugger (1950) bei Monocotyledonen beschreibt (Abb. 16). Es konnten etwa 7–12 Grana übereinander und etwa 6–10 Grana nebeneinander ausgezählt werden. Diese geldrollenförmige Anordnung der Grana scheint, wie auf Grund dieser Beobachtungen vermutet werden kann, nicht nur den monocotylen, sondern auch den dicotylen Pflanzen zuzukommen.



Abb. 14. *Primula Sinensis*. Plastidenvakuolisierung im Mesophyll nach dreistündiger Belichtung in Nikotin (1 : 2000). Belichtung 15 000 Lux.

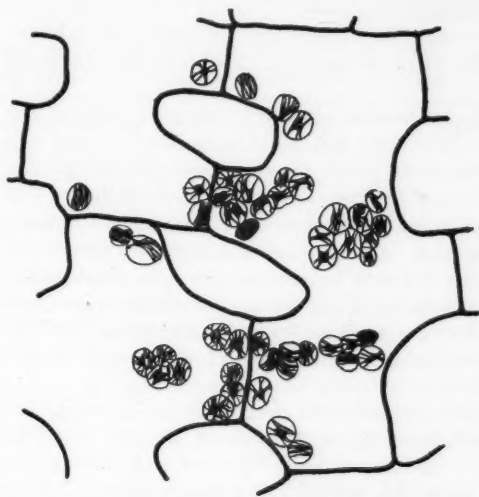


Abb. 15. *Lilium candidum*. Vakuolenbildung der Plastiden im Mesophyll nach dreistündiger Belichtung mit 15 000 Lux in einer Nikotinlösung (1 : 2000). (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)

Bei *Drimiopsis maculata* ließ sich sehr schön erkennen, wie sich während der Vakuolenbildung der Chloroplasten eine feine Haut von dem Plastidenstroma abhob und die Plastiden umspannte (Abb. 17). Während der Aufquellung der Chloroplasten konnte verschiedentlich beobachtet werden, daß die Grana als Verdickungen der Lipoidlamellen reihenförmig übereinander liegen.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Betrachtet man die Vakuolisationserscheinungen der Chloroplasten bei Land- und Wasserpflanzen, so ist auffallend, daß die Vakuolenbildung bei den verschiedenen Pflanzen sehr unter-

schiedlich verläuft und auch innerhalb einer Pflanze, ja oft innerhalb einer Zelle beträchtliche Unterschiede aufweisen kann.

Diese unterschiedliche Vakuolenbildung könnte durch ein abweichendes Verhalten der verschiedenen Pflanzen gegenüber den Alkaloiden hervorgerufen werden.

Wie die Versuche mit *Sagittaria natans* und *Vallisneria spiralis* sowie die Versuche mit ganzen Blättern oder Blattstücken zeigen, tritt in der Tat eine verschieden starke Speicherung der Alkaloide auf. Der Grund hierfür liegt aber nicht in der unterschiedlichen Aufnahmefähigkeit der einzelnen Zellen für Alkaloide, sondern darin, daß die Alkaloide infolge ihrer langsamen Wandergeschwindigkeit, hervorgerufen durch die elektrostatische Adsorption an den Zellwänden sowie durch die elektive Speicherung durch die Zellinhalte der Leitbündelscheiden, nur sehr spät oder in vielen Fällen überhaupt nicht in die einzelnen Blattabschnitte gelangen. Bei den Versuchen mit den dünnen Blättern von Wasserpflanzen und den Epidermishäutchen oder Flächenschnitten von Landpflanzen ließen die Alkaloide sich hingegen schon nach kürzester Zeit in allen Zellen nachweisen. Eine verschieden starke Alkaloidspeicherung dürfte daher wohl bei größeren Blattstücken oder bei ganzen Blättern, nicht aber bei Flächenschnitten, bei Epidermishäutchen oder bei Blättern, die mit der Gesamtoberfläche die Stoffe aus dem Wasser aufnehmen, den Ausschlag für die unterschiedliche Vakuolenbildung geben.

Erst recht kann aber das sehr unterschiedliche Verhalten der Chloroplasten innerhalb einer Zelle nicht durch einen Speicherungsunterschied erklärt werden.

Untersucht man die Frage, ob Stärke- und Zuckerpflanzen sich bei der Vakuolenbildung der Chloroplasten unterschiedlich verhalten, wie es Lärz (1942) vermutete, so darf man diese Frage ebenfalls wohl mit ziemlicher Sicherheit verneinen. Denn einmal bildeten Pflanzen, die zweifellos zu den amylophyllen zu zählen sind, wie z. B. *Pelargonium*, *Nicotiana*, *Chrysanthemum* und *Primula*, schon nach verhältnismäßig kurzer Belichtungszeit Plastidenvakuolen. Dagegen ließen sich bei einigen als saccharophyll bekannten Pflanzen, wie *Iris*, *Clivia* und *Tulipa*, nur sehr schwer oder überhaupt keine Plastidenvakuolen hervorrufen. Andere saccharophylle Pflanzen, wie *Yucca*, *Lilium*, *Drimiopsis*, bildeten dagegen schon nach kurzer Belichtung prächtige Vakuolen.

Die vorliegenden Untersuchungen scheinen eher dafür zu sprechen, daß eine für die verschiedenen Pflanzen charakteristische Konsistenz der Plastiden die Ursache dafür ist, daß bei einigen Pflanzen das Stroma der Plastiden leicht aufquellen kann, bei anderen dagegen weniger.

Ob das unterschiedliche Verhalten der Chloroplasten innerhalb einer Zelle ebenfalls auf eine Abweichung in der Konsistenz der Plastiden zurückzuführen ist, ist schwer zu entscheiden. Küster (1937, 104) meint zwar, daß die Resistenz der Plastiden einer Zelle deutlich verschieden sein kann, da ihm bei der Untersuchung kräftig wachsender *Bryopsis*-Fäden zuweilen auffiel, daß in Wasser nur ein geringer Teil der Chloroplasten (1%) sich vakuolisierte, daß aber alle anderen derselben Zelle normal erhalten blieben.

Bei der Belichtung in Alkaloiden dürfte aber der Unterschied im Vakuolisationsgrad innerhalb einer Zelle eher in einer verschiedenen starken Assimilationstüchtigkeit der Chlorophyllkörner begründet sein. Denn einmal nahm die Größe der Vakuolen in den Plastiden, die anfänglich nur kleine Vakuolen zeigten, noch zu, wenn die anderen Chloroplasten kaum noch eine Vergrößerung der Vakuolen erkennen ließen. Zum anderen ging bei der Plasmolyse mit Traubenzucker die Vakuolenbildung in diesen weniger aufgequollenen Chloroplasten schneller zurück als in den stärker

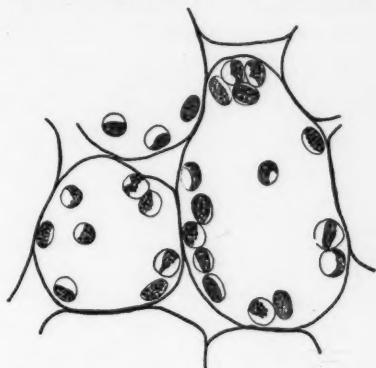


Abb. 16. *Nicotiana affinis*. Plastiden-vakuolisierung im Mesophyll. Einzelne Chloroplasten zeigen in der Seitenansicht eine geldrollenförmige Anordnung der Grana. (Nach der Natur mit dem Zeichenapparat gezeichnet.)

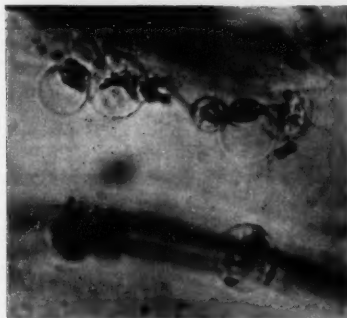


Abb. 17. *Drimiopsis maculata*. Plastiden-vakuolisierung im Mesophyll nach eineinhalbstündiger Belichtung mit 20 000 Lux in Nikotin (1 : 2000).

vakuolisierten. Das spricht dafür, daß die osmotischen Werte in ersteren nicht so hoch liegen wie in letzteren. Nimmt man an, daß die Photosynthese bei allen Chloroplasten gleich stark, die Konsistenz aber ungleich ist, so dürften trotz der unterschiedlichen Vakuolisierung die osmotischen Werte doch in allen Chloroplasten gleich hoch liegen. Infolgedessen müßte während der Plasmolyse bei allen Chloroplasten die Vakuolisierung gleichmäßig zurückgehen. Das war aber bei den Versuchen nicht der Fall. Es zeigte sich im Gegenteil sehr deutlich, daß der osmotische Wert der einzelnen Chloroplasten und damit auch die Assimilationstüchtigkeit innerhalb einer Zelle sehr unterschiedlich sein kann.

Die physiologische Wirkung der Alkaloide scheint, wie aus den Versuchen mit Landpflanzen hervorgeht, nicht nur, wie Lärz (1942) es vermutet, in einer Verdichtung der Plastidengrenzschicht zu beruhen, sondern mehr komplexer Natur zu sein. Wahrscheinlich greifen die Alkaloide auch in die enzymatische Regulierung des Stärkeauf- und -abbaues ein. Es besteht nämlich kein Grund zur Annahme, daß der Aufbau der Stärke bei amylophyllen Land- und Wasserpflanzen ohne weiteres unterbleiben sollte, auch wenn eine Verdichtung der Plastidengrenzschicht angenommen wird;

Plastidenvakuolen dürften aber bei amylophyllen Pflanzen nicht auftreten, wenn nicht die Kondensation des Assimilationszuckers zu Stärke irgendwie beeinflusst wird. Für diese Vermutung spricht einmal, daß bei der Vakuolenbildung der Chloroplasten niemals ein Zuwachs von Stärke festgestellt werden konnte. Entweder blieben die Stärkekörner, die vor der Belichtung in den Chloroplasten auftraten, in ihrer Größe erhalten oder sie traten auch bei sehr langer Belichtung nicht auf, wenn sie vorher nicht vorhanden waren. Zum anderen bildeten sich Plastidenvakuolen in Nikotin- oder Physostigminlösungen dann, wenn in den in Leitungswasser belichteten Kontrollblättern die ersten kleinen Stärkekörner sichtbar wurden. Wird aber nur die enzymatische Regulierung des Störkeaufbaues beeinflusst, dann müßte zusätzlich noch die Semipermeabilität der Plastidengrenzschicht beeinflusst werden, da auch extrem saccharophylle Pflanzen, wie z. B. *Yucca* und *Allium*, sehr leicht zur Chloroplastenvakuolisierung neigten.

Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß die Alkaloide die Kondensation der Monosaccharide zu Di- oder Oligosacchariden verhindern. Unter diesen Umständen könnte die Plastidenvakuolisierung erklärt werden, ohne ein Anwachsen der Semipermeabilität der Plastidengrenzschicht annehmen zu müssen. Denn die Verhinderung der Entstehung weniger osmotisch wirksamer Stoffe müßte bei Stärkepflanzen und auch bei Zuckerpflanzen zu höheren osmotischen Werten und damit zur Vakuolenbildung führen.

C. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wurde die Wirkung von Alkaloiden und Anaesthetica auf die Chloroplasten überprüft. Gleichzeitig wurde der Versuch unternommen, eine Methode auszuarbeiten, mit der die Assimilationsfähigkeit einzelner Chloroplasten festgestellt werden kann.

2. Außer den Alkaloiden und Anaesthetica Nikotin, Cocain, Atropin, Coniin, Novocain und Pantocain (nach Lärz 1942, Hanssen 1947) rufen auch Ephedrin, Arecolin, Physostigmin, Pervitin, Scopolamin und Larocain eine intravitale Plastidenvakuolisierung bei gleichzeitiger Belichtung hervor. Die Vakuolisierung der Chloroplasten ist reversibel. Sie konnte in Physostigmin-, Arecolin- und Scopolaminlösungen mehrere Male nach Einschaltung einer Wässerung und Verdunklung wiederholt werden.

Die Vitalität der Vakuolenbildung konnte durch die Weiterkultur von Sprossen, die in Arecolin vorbehandelt wurden, deutlich gemacht werden.

Rückschlüsse auf die physiologische Wirkung der Alkaloide lassen sich auf Grund ihrer chemischen Struktur nur sehr schwer machen. Es scheinen in erster Linie Löslichkeitsverhältnisse, lipophile und lipophobe Endgruppen, für die Wirkung auf die Plastiden maßgebend zu sein.

3. Die Prüfung der Alkaloidaufnahme und -leitung mit Jod-Jodkalium bei *Vallisneria* und *Sagittaria natans* ergab, daß die Alkaloide sich bei ihrer Wanderung wie basische Farbstoffe verhalten. Die Ausbreitung in den Blättern erfolgte von den Hauptnerven aus; über die Quernerven wurden von diesen die Seitennerven versorgt. Wegen der elektiven Speicherung

durch die Zellinhalte der Leitbündelscheiden gelangten die Alkaloide erst sehr spät in die Blattfelder.

4. Mittels der etwas veränderten Osazonprobe konnte in den nicht erwärmten Blättern von *Helodea* in der Nähe der Plastidenansammlungen (nach vorausgegangener Belichtung in Nikotin) eine Anhäufung der Osazonkristalle festgestellt werden. Damit dürfte die Vermutung von Lärz (1942), daß der osmotische Wert der Plastidenvakuolen durch den bei der Photosynthese entstehenden Zucker hervorgerufen wird, auch direkt ihre Bestätigung gefunden haben.

5. Die Abhängigkeit des osmotischen Wertes der Plastidenvakuolen von der Belichtungszeit wurde einer näheren Analyse unterzogen. Der osmotische Wert der Plastidenvakuolen stieg bei der Belichtung in Physostigminlösungen in den ersten 20 Minuten langsam an. Danach erfolgte ein stärkerer linearer Anstieg bis zu einem Werte, der einer 0,9–1,0 mol. Traubenzuckerlösung entsprach. Von diesem Punkte an nahmen die osmotischen Werte nur noch langsam bis zu einem Endwert von 1,2 Mol Traubenzucker zu.

6. Mittels der Winklermethode der O_2 -Bestimmung wurde die Assimilation von *Helodea*-Sprossen während der Belichtung in Alkaloidlösungen gemessen. Dabei wurde gleichzeitig die Veränderung und Vakuolenbildung der Chloroplasten verfolgt.

Exakte quantitative Assimilationsmessungen konnten nicht durchgeführt werden, da sich herausstellte, daß Oxydationsprozesse der Alkaloide die Assimilationsbestimmungen beeinflussten. Es konnte aber die Feststellung gemacht werden, daß trotz der Anwesenheit der Alkaloide eine Assimilation stattfand und daß die Assimilationstüchtigkeit der Chloroplasten zumindest bei Beginn der Vakuolenbildung nicht allzu stark gehemmt wird. Bei stärkerer Vakuolenbildung, bei einem osmotischen Wert von 0,9–1,0 Mol Traubenzucker, erfolgte dagegen ein stärkerer Abfall der Photosynthese.

7. Da bei *Helodea* erstens die Plastidenvakuolisierung immer nur bei Belichtung erfolgt und im Dunkeln in Leitungswasser reversibel ist, da zweitens der osmotische Wert in den Chloroplasten anfänglich linear mit der Zeit ansteigt und da drittens die Assimilation durch die Alkaloide bei Beginn der Plastidenvakuolisierung nicht allzu stark gehemmt wird, dürfte sich zumindest bei *Helodea* die Vakuolenbildung dazu verwerten lassen, die Assimilationsfähigkeit einzelner Chloroplasten zu prüfen.

8. Eine Vakuolenbildung in ganzen Blättern oder größeren Blattstücken von Landpflanzen war nicht zu erzielen, da die Alkaloide nur sehr spät oder überhaupt nicht in die Blattflächen eindrangen. Mit Alkaloiden infiltrierte Blätter ergaben ebenfalls keine Vakuolenbildung, da die Photosynthese untergetauchter Blätter von Landpflanzen durch die niedrige CO_2 -Spannung des Wassers sehr stark behindert wird.

Dagegen trat in Epidermishäutchen und Flächenschnitten, die auf einer Alkaloidlösung schwimmend belichtet wurden, bei den weitaus meisten Pflanzen eine intravitale Vakuolenbildung der Plastiden auf. Auffallend war jedoch einmal der unterschiedliche Vakuolisierungsgrad bei den einzel-

nen Pflanzen, zum anderen die Tatsache, daß die Vakuolenbildung bei einigen Pflanzen sehr früh, bei anderen viel später einsetzte.

9. Die unterschiedliche Vakuolenbildung bei verschiedenen Land- und Wasserpflanzen dürfte nicht durch ein unterschiedliches Verhalten von Zucker- und Stärkepflanzen bedingt sein. Auch ein abweichendes Speichervermögen einzelner Pflanzen für Alkaloide konnte nicht beobachtet werden. Zur Erklärung der unterschiedlichen Vakuolenbildung wird angenommen, daß die Chloroplasten der verschiedenen Pflanzen eine unterschiedliche Konsistenz besitzen.

10. Der unterschiedliche Vakuolisationsgrad innerhalb einer Zelle wird vermutlich durch eine unterschiedliche Assimilationsleistung der Chloroplasten hervorgerufen.

11. Die Wirkung der Alkaloide kann nicht nur, wie Lärz vermutet, in einer Verdichtung der Plastidengrenzschicht bestehen, sondern dürfte auch durch eine Beeinflussung des enzymatischen Aufbaues der Monosaccharide zu Oligo- und Polysacchariden in den Chloroplasten hervorgerufen werden.

12. Bei *Nicotiana affinis* trat während der Aufquellung und Vakuolenbildung die von Strugger (1950) bei Monocotyledonen beobachtete geldrollenförmige Anordnung der Grana sehr schön hervor. Auch bei *Drimyopsis maculata* ließ sich die Reihenanordnung der Grana während der Aufblätterung in Nikotinlösungen sehr gut beobachten.

Literatur

- Alsterberg, G., 1926: Die Winklersche Bestimmungsmethode für in Wasser gelösten elementaren Sauerstoff sowie ihre Anwendung bei Anwesenheit oxydierbarer Substanzen. *Bioch. Zeitschr.* 170, 30.
- Bauer, L., 1943: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora* 136, 30.
- Baumeister, W., 1943: Der Einfluß des Bors auf die Photosynthese und Atmung submerser Pflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.* 41, 242.
- Brenner, W., 1920: Über die Wirkung von Neutralsalzen auf die Säureresistenz, Permeabilität und Lebensdauer der Protoplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 38, 277.
- Doutreligne, J., 1935: Note sur la structure des chloroplastes. *Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam Proc.* 38, 886.
- Drawert, H., 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 134, 159.
- Fischer, E., 1890: Synthesen in der Zuckergruppe. *Ber. Dtsch. chem. Ges.* 23, 2.
- Frey-Wyssling, A., 1938a: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. *Protoplasma-Monographien* 15, Berlin 1938.
- 1938b: Der Aufbau der Chlorophyllkörner (Sammelreferat). *Protoplasma* 29, 279.
- Gahlen, K., 1935: Beiträge zu Physiologie der Blattzellen von *Helodea canadensis*. *Protoplasma* 22, 337.
- Geitler, L., 1937: Über den Granabau der Plastiden. *Planta* 26, 465.
- Gessner, F., 1937: Untersuchungen über die Assimilation und Atmung submerser Wasserpflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.* 85, 267.
- 1940: Beiträge zur Biologie amphibischer Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 58, 2.

- Hanssen, E., 1947: Untersuchungen über die Einwirkung von Alkaloiden und einigen Anaesthetics auf die Pflanzenzelle. Diss. Techn. Hochschule Hannover 1947.
- Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromocentren. *Planta* 18, 616.
- 1936a: Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilationseinheiten der Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 54, 562.
- 1936b: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. *Planta* 26, 134.
- Herbst, W., 1937: Das *Helodea*-Blatt als Testobjekt zum Studium der Wirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln. *Protoplasma* 27, 455.
- Hubert, B., 1935a: Diss. Leyden, zitiert nach Frey-Wyssling 1938a.
- 1935b: The physical state of chlorophyll in the living Plastid. *Rec. trav. bot. néerland* 32, 323.
- Kausche, G. A., und Ruska, H., 1940: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Chloroplasten. *Naturwiss.* 28, 303.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographie* 13, II, 1937.
- Lärz, H., 1942: Beiträge zur Pathologie der Chloroplasten. *Flora, Neue Folge* 35, 219.
- Mangham, S., 1915: Observations on the Osazone Method of locating Sugars in Plant Tissues. *Annals of Bot.* 29, 369.
- Meyer, A., 1885: Mikrochemische Reaktion zum Nachweis der reduzierten Zuckerarten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1885, 332.
- Menke, W., 1940a: Die Lamellarstruktur der Chloroplasten im ultravioletten Licht. *Naturwiss.* 28, 158.
- 1940b: Untersuchungen über den Feinbau des Protoplasmas mit dem Universal-Elektronenmikroskop. *Protoplasma* 35, 115.
- und Koydl, E., 1939: Direkter Nachweis des lamellaren Feinbaus der Chloroplasten. *Naturwiss.* 27, 29.
- Molisch, H., 1923: Mikrochemie der Pflanze. Jena 1923, 3. Aufl.
- Nagamatz, A., 1888: Beiträge zur Kenntnis der Chlorophyllfunktion. *Arb. Bot. Inst. Würzburg* 3, 389.
- Popoff, K. J., 1941: Über die Assimilation von Landpflanzen-Blättern unter Wasser. *Jahrb. wiss. Bot.* 89, 754.
- Rabinowitch, E. I., 1945: *Photosynthesis and Related Processes* I. Interscience Publishers, Inc. New York, N. Y. 1945.
- Roberts, E. A., 1942: Zitiert nach Rabinowitch 1945.
- Senft, E., 1904: Über den mikrochemischen Zuckernachweis durch essigsaures Phenylhydrazin. *Sitzungsber. Kaiserl. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturwiss. Kl.* 63, Abt. 1, 5.
- Spoeher, H. A., 1926: *Photosynthesis*. The Chemical Catalog Company, Inc. New York.
- Strugger, S., 1935: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie*. Borntraeger, Berlin, 1. Aufl.
- 1938: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. I. Die Methode und die ersten Beobachtungen. *Flora* 133, 56.
- 1939a: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. II. Die Eigenschaften des Berberinsulfates und seine Speicherung durch lebende Zellen. *Biol. Zentralbl.* 59, 274.
- 1939b: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. III. Untersuchungen von *Helxine Soleirollii*. *Req. Biol. Zentralbl.* 59, 409.

- 1947: Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. Zeitschr. f. Naturforsch. Bd. 2b, 146.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer-Verlag 1949, 2. Aufl.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und der Chloroplasten (vorläufige Mitteilung). Die Naturwiss. 37. Jahrgang, Heft 7, 166.
- Treboux, O., 1903: Einige stoffliche Einflüsse auf die Kohlensäureassimilation bei submersen Wasserpflanzen. Flora 92, 49.
- Troll, W., 1948: Allgemeine Botanik. Stuttgart 1948.
- Tunmann, O.-Rosenthaler, L., 1931: Pflanzenmikrochemie. Berlin 1931, 2. Aufl.
- Weier, E., 1936a: The structure of the non-starch-containing beet chloroplast. American Journ. Bot. 23, 645.
- 1936b: The structure of the chloroplast of *Pellionia pulchra*. Cytologia 7, 504.
- Wieler, A., 1936: Über den Bau der Chlorophyllkörner. Protoplasma 26, 295.
- Willstätter, A., und Stoll, A., 1918: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Über das optische Verhalten von Safraninen und Aposafraninen in den verschiedenen Komponenten des Protoplasmas

Von

Josef Spek, Rostock¹

Mit 3 Textabbildungen

(Eingelangt am 6. Februar 1951)

Seitdem es mir gelungen war, von vitalgefärbten Zellen Spektren zu entwerfen, konnten Vitalfärbungen aller Art einer genaueren optischen Analyse unterworfen werden. Erst auf diesem Wege konnte erkannt werden, daß zahlreiche Farbstoffe, wenn sie in bestimmten Substanzen der lebenden Zelle gelöst oder von ihnen adsorbiert sind, sich optisch anders verhalten als in einer Lösung in Wasser. Ein besonders lehrreiches Beispiel dieser Art ist das Verhalten von Irisblau und anderen Oxazinen in Phosphatiden (J. Spek, 1942). Das Spektrum von Irisblau ist, wenn es innerhalb oder außerhalb der Zellen in den genannten Lipoiden gelöst ist, ein ganz anderes als das der wäßrigen Lösung. Eine Bande desselben ist außerordentlich verstärkt, eine andere dagegen viel schwächer als im Spektrum der wäßrigen Lösung. Die erste Differenz beruht darauf, daß der Farbstoff in den Phosphatiden viel stärker fluoresziert als in Wasser. Die Absorptionsbande des fluoreszenzerregenden Lichtes liegt im sichtbaren Teil des Spektrums, und sie ist es, welche bei Lösung des Farbstoffes in Phosphatiden so sehr verstärkt erscheint. Die Veränderung des Spektrums wirkt sich natürlich auch im Farbton der Färbung aus, und die Verstärkung der roten Fluoreszenz ist so enorm, daß vitalgefärbte Zellen oder Zellbezirke, in denen der Farbstoff in den Phosphatiden sitzt, auch schon bei blasser Anfärbung und nicht besonders starken Lichtquellen im gewöhnlichen Dunkelfeldbilde in grellem rotem Licht erstrahlen.

Eigentlich deutet die starke Fluoreszenzsteigerung in der Zelle einen wasserfreien Ort an. Sie tritt nämlich in allen wasserfreien organischen Lösungsmitteln ein. Es ist das Wasser, welches die starke Fluoreszenz hemmt. Haben die organischen Lösungsmittel relativ kleine Moleküle mit lipophilen und hydrophilen Gruppen, so verschwindet die starke Fluoreszenz bei Zusatz von Wasser augenblicklich. Zwischen den mit Wassermolekülen umlagerten hydrophilen Gruppen finden die an den

¹ Die meisten Versuchsserien wurden noch im Zoologischen Institut in Heidelberg ausgeführt.

lipophilen Gruppen des Lösungsmittels sitzenden relativ großen Farbstoffmoleküle offenbar nicht genügend Raum, der von Wasser frei bleibt, um die starke Fluoreszenz zu entfalten. So liegen die Verhältnisse z. B. bei Lösungen des Farbstoffes in Methyl- oder Äthylalkohol. Die Lösungen in den reinen Alkoholen fluoreszieren sehr stark, die in verdünntem Alkohol ganz beträchtlich schwächer. Wählen wir dagegen Lösungsmittel, die neben einzelnen hydrophilen Gruppen größere lipophile Gruppen oder längere Ketten mit lipophilen Eigenschaften im Molekül besitzen, dann wird die Chance für den Farbstoff immer größer, daß seine starke Fluoreszenz auch bei Wasserzusatz erhalten bleibt, da mit der Länge der lipophilen Gruppen die „wasserfreien Orte“ im System immer größer werden. Das Extrem dieser Verhältnisse liegt bei den Phosphatiden vor, in denen der Farbstoff auch bei starker Quellung des Lösungsmittels eine enorme Fluoreszenz zeigt. Einzelheiten müssen in der Originalarbeit nachgelesen werden, in der das Verhalten der Farbstoffe in ganzen Serien von organischen Lösungsmitteln beschrieben wurde. Hydrophile Gruppen muß das Lösungsmittel deswegen enthalten, weil das Farbsalz von Irisblau in rein lipophilen Lösungsmitteln wie Xylol oder Neutralfetten unlöslich ist. Bei allen Diskussionen über „Lipoidlöslichkeit“ müssen wir immer klar unterscheiden zwischen Löslichkeit in Lipiden (oder physikalisch sich ähnlich verhaltenden anderen organischen Lösungsmitteln) mit rein lipophilen Eigenschaften und solchen mit lipophilen + hydrophilen Gruppen. Wie es auch theoretisch erwartet werden muß, bestehen bei den allermeisten Farbstoffen beträchtliche Unterschiede zwischen ihrer Löslichkeit in den beiden genannten Gruppen organischer Lösungsmittel.

Wäre das Protoplasma ein wasserfreies Gemisch organischer Substanzen, so würden Irisblau und die anderen sich entsprechend verhaltenden Farbstoffe noch in vielen anderen Komponenten des Protoplasmas das „Phosphatidspektrum“ und die starke Fluoreszenz zeigen. Bei dem tatsächlich vorliegendem hohen Wassergehalt dagegen dürften, nach den zahlreichen Modellversuchen zu schließen, die Phosphatide meistens die einzige Stoffgruppe sein, welche in der Zelle für die Entstehung des „Phosphatidspektrums“ der in Frage stehenden Farbstoffe verantwortlich zu machen ist.

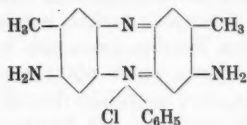
Die präzise Unterscheidung vom „Wasserspektrum“ und „Phosphatidspektrum“ der Farbstoffe ist bei den vitalgefärbten Zellen vielfach dadurch erschwert, daß uns die Konzentration des in einer Zellstruktur angereicherten Farbstoffes unbekannt ist und die Schichtdicke der gefärbten Zone sich meist nur annähernd bestimmen läßt. Würde die Lichtabsorption der Farblösungen durchwegs dem Lambert-Beerschen Gesetz gehorchen, so würde dies weniger ins Gewicht fallen. Bei höherer Konzentration oder größerer Schichtdicke würden dann einfach alle Banden verstärkt und verbreitert erscheinen, und das Stärkeverhältnis der verschiedenen Banden würde — von ganz hohen Konzentrationen abgesehen — bei allen Konzentrationen im wesentlichen das gleiche bleiben. Eine Herabsetzung der Farbkonzentration würde sich stets so wie eine Verringerung der Schichtdicke auswirken. Für fluoreszierende Farbstoffe trifft nun aber dies alles vielfach nicht zu. Ihre Lichtabsorption folgt nur teilweise dem Lambert-Beerschen Gesetz, denn da

die Fluoreszenzerregung in verdünnten Lösungen, wie schon Stokes fand, relativ viel stärker ist, erscheint bei diesen Konzentrationen auch die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes, verglichen mit einer Bande, welche mit der Fluoreszenzerregung nichts zu tun hat, beträchtlich verstärkt, und das Stärkeverhältnis der beiden Banden kann sich bei genügend weit auseinanderliegenden Konzentrationen sogar umkehren. So beruht bei Irisblau, wie schon erwähnt wurde, die Spezifität des „Phosphatidspektrums“ auf einer außerordentlichen Verstärkung der Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes (Bande 1). Sie ist in Phosphatiden (oder wasserfreien organischen Lösungsmitteln) viel stärker als die Bande 3 (Bande des Farblösions), die mit der Fluoreszenzerregung nicht viel zu tun hat, während in höheren Konzentrationen der wäßrigen Lösungen oder bei stärkeren Anfärbungen von rein hydrophilen Substanzen Bande 1 schwächer ist als Bande 3. Bei sehr verdünnten wäßrigen Lösungen dagegen ist Bande 1 stärker als Bande 3. Die Konzentration dieser Lösungen liegt zwar unter der in den vitalgefärbten Objekten in der Regel vorliegenden Farbkonzentration, aber Kontrollen durch Vergleich des vitalgefärbten Präparates mit einer Farblösung gleicher Schichtdicke und gleicher Farbstärke müssen immerhin ausgeführt werden und sind ziemlich zeitraubend. So ging ich, nachdem nun einmal der Weg eröffnet war, mit Hilfe eines spezifischen Spektrums an bestimmte Bausteine des Protoplasmas heranzukommen, darauf aus, auch Farbstoffe zu finden, bei denen man nicht das variable Stärkeverhältnis von Banden zur Unterscheidung der Spektren nötig hatte. Die verschiedenen Spektren von einem solchen Farbstoff (Rose bengale Gröbler) habe ich schon in meiner Arbeit von 1942 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Befunde dieser Art mitgeteilt werden.

Durch zufällige Beobachtungen wurde ich darauf aufmerksam, daß die gelbgrüne Fluoreszenz von Safranin in alkoholischen Lösungen viel stärker ist als in Wasser. Ein solcher Unterschied der Fluoreszenzstärke in Alkohol und Wasser ist für Safranin selbst und andere Safranine und Aposafranine auch in der Literatur verzeichnet (vgl. G. Schultz, Farbstofftabellen 1931). Die genauere Untersuchung lehrte, daß die Verhältnisse bei diesen Farbstoffen ganz ähnlich liegen wie bei Irisblau und den anderen von mir beschriebenen Oxazinen, daß aber die Spektren z. T. die gewünschten Vorzüge gegenüber denen der Oxazine zeigen und daß überdies einige der neuuntersuchten Farbstoffe zu Vitalfärbungen ausgezeichnet geeignet sind, so daß sie verdienen, in die mikroskopische Technik eingeführt zu werden. Eine Untersuchung des Verhaltens der Safranine erschien mir auch deswegen besonders interessant, da einige von ihnen metachromatische Farbstoffe im Sinne der Histologen sind, d. h. mit einer bestimmten Gruppe von organischen Substanzen, die man auch als chromotrope Substanzen bezeichnet (Kohlehydrate mit einer Schwefelsäuregruppe oder Eiweißkörpern, die eine solche Kohlehydratgruppe enthalten), einen spezifischen, anders gefärbten Komplex bilden (vgl. J. Spek 1940 und 1943, hier auch ältere Literatur), so daß also bei ihnen eventuell die Möglichkeit besteht, noch eine andere Gruppe von Zellsubstanzen durch eine spezifische Färbung nachzuweisen.

Versuche mit Safranin T

Safranin ist ein basischer Farbstoff. Es hat die Formel:



Der untere Benzolring kann eine Methylgruppe tragen. Safranin T (Ludwigshafen) ist sowohl in Wasser als auch in absolutem Alkohol gut löslich. In rein lipophilen Lösungsmitteln dagegen ist das Farbsalz unlöslich. Das Farbpulver bleibt in Xylol und selbst in geschmolzenem frischem Schweinefett ungelöst. Aus neutralen und schwach alkalischen wäßrigen Farblösungen treten beim Schütteln geringe Mengen der orangegelben Farbbase in Xylol über. Auch frisches Fett (Hammelfett) färbt sich in solchen Lösungen blaß orange-gelb an. Aus stark alkalischen Lösungen läßt sich mit Xylol allmählich der ganze Farbstoff als Farbbase ausschütteln. Die Anfärbung von Neutralfetten in schwach alkalischen Farblösungen dürfte zu blaß sein, um in mikroskopischen Schichten erkannt zu werden. Lecithin verhält sich auch diesem Farbstoff gegenüber wie die anderen organischen Lösungsmittel, welche sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften haben (vgl. Äthylalkohol). Es färbt sich stark mit dem Farbsalz an. Auch bei den Safraninen ist also die Löslichkeit in lipophilen + hydrophilen Lipoiden wesentlich anders als in den rein lipophilen.

In verdünnten wäßrigen Lösungen ist eine diffuse, breite Bande mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei $499\text{ m}\mu$ zu sehen. Abb. 1a zeigt das Spektrum einer solchen Lösung, wie es sich im Engelmanschen Mikrospektralphotometer bei einer Konzentration, die gerade noch das Maximum deutlich erkennen läßt, und einer Schichthöhe von 3 mm darbietet.² Das Spektrum einer alkoholischen Lösung von gleicher Farbstärke und Schichthöhe zeigt ein ganz anderes Bild (Abb. 1b). In ihr ist zwischen etwa 525 und $540\text{ m}\mu$ eine nach oben scharf begrenzte, nach unten allmählich abnehmende Bande von außerordentlicher Dunkelheit zu sehen, die ihr Maximum bei etwa $536\text{ m}\mu$ hat. Im Bereich der matten Bande der wäßrigen Lösung ist in der alkoholischen kein Maximum zu erkennen.

Belichtet man eine verdünnte alkoholische Lösung von Safranin mit dem Zeißschen Monochromator bei Verwendung einer Bogenlampe als Lichtquelle der Reihe nach mit monochromatischem, sichtbarem Licht aller Wellenlängenbereiche, dann kann man im dunklen Raum in einem ziemlich engbegrenzten Wellenlängenbereich, und zwar zwischen 528 und $550\text{ m}\mu$, ein

² Die Abbildungen wurden nach dem subjektiven Bild der Absorptionsbanden mit der Hand gezeichnet; sie können also nicht als quantitativer Beleg verwendet werden, dürften aber dem Leser das Verständnis des Textes doch sehr erleichtern. Bei der Reproduktion pflegt das Bild blasser Banden auch nur annähernd so herauszukommen, wie es in der Zeichnung vorlag. — Die Herstellung photographischer Aufnahmen von den vom Engelmanschen Mikrospektralphotometer entworfenen Spektren stieß auf zu große technische Schwierigkeiten.

starkes Fluoreszenzlicht auftreten sehen. Bei ungefähr $535\text{ m}\mu$ wird es am allerhellsten, unterhalb $528\text{ m}\mu$ wird es beträchtlich schwächer, und oberhalb 550 ist es kaum zu sehen. Da der Wellenlängenbereich der stärksten Fluoreszenzerregung mit der starken Bande recht gut zusammenfällt, ist diese als Absorptionsbande des fluoreszenzerregenden Lichtes aufzufassen. In den wäßrigen Lösungen tritt bei Belichtung mit dem monochromatischen Licht nur ein ganz mäßiges Fluoreszenzlicht auf. Es genügt aber, um festzustellen, daß die Fluoreszenzerregung im Bereich der Bande der wäßrigen Lösungen, also bei $499\text{ m}\mu$, keine Verstärkung erfährt, eine schwache Verstärkung des Fluoreszenzlichtes ist vielmehr bei ungefähr $532\text{ m}\mu$ zu erkennen. Die auf Abb. 1 a eingezeichnete Bande hat also im wesentlichen mit der Absorption des fluoreszenzerregenden Lichtes nichts zu tun, wenn sie auch wahrscheinlich noch von einer sehr schwachen diffusen Lichtabsorption dieser Art überlagert ist. Der Hauptabsorptionsbereich des fluoreszenzerregenden Lichtes liegt vielmehr auch in der wäßrigen Lösung ungefähr an der gleichen Stelle wie in der alkoholischen (im Sinne der Kundtschen Regel etwas nach Violett verschoben), erscheint aber im Spektrum infolge der viel schwächeren Fluoreszenz der wäßrigen Lösung nur als schwacher, dif-

fuser Ausläufer der Bande nach oben, der in dem relativ lichtschwachen Engelmannschen Mikrospektralphotometer kein Maximum erkennen läßt (G. Schultz gibt für Safranin T extra ein schwaches, mit Fragezeichen versehenes Maximum bei $529\text{ m}\mu$ an). Für die Richtigkeit dieser Deutung spricht das Aussehen des Spektrums einer viel konzentrierteren, nämlich 0,5%igen wäßrigen Lösung. Um ein solches zu erhalten, muß ein Tropfen der Lösung zwischen Objektträger und Deckglas ausgebreitet und im Engelmannschen Mikrospektralphotometer eingestellt werden. Durch Flüssigkeitsmengen größerer Schichtdicke könnte man ja bei dieser Konzentration nicht durchsehen. Das Spektrum zeigt eine sehr dunkle Bande an der Stelle der Bande von Abb. 1 a. Entsprechend der in der konzentrierten Lösung viel schwächeren Fluoreszenz fehlt aber der Ausläufer dieser Bande nach oben oberhalb $515\text{ m}\mu$ fast vollständig. Absorptionsbanden von fluoreszenzerregendem Licht sind durch einen scharfen oberen Rand ausgezeichnet. Er entsteht dort, wo die Lichtabsorption durch das ausgesandte Fluoreszenzlicht überstrahlt wird. Der obere Ausläufer der Bande der verdünnten wäßrigen Lösungen (vgl. Abb. 1 a) ist nach Rot auch durch einen scharfen Rand begrenzt.

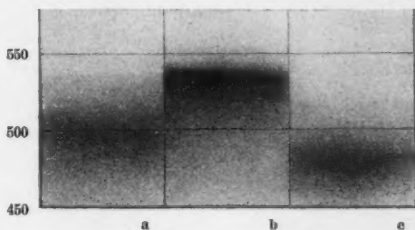


Abb. 1. a) Spektrum von Safranin T in verdünnter wäßriger Lösung. b) Spektrum von Safranin T in alkoholischer Lösung gleicher Farbstärke und Schichthöhe. c) Spektrum von Safranin T in wäßriger Lösung bei Zusatz von Agar (metachromatische Modifikation). Die Zahlen am Rande links bedeuten jeweils Wellenlängen in $\text{m}\mu$.

Im Prinzip liegen also die Verhältnisse bei Safranin ebenso wie bei Irisblau. Während in den wasserfreien Lösungen die Bande des fluoreszenz-erregenden Lichtes (Bande 1) entsprechend der sehr verstärkten Fluoreszenz sehr kräftig ist, liegt an ihrer Stelle bei den wäßrigen Lösungen nur eine schwache diffuse Verdunkelung, die auch in den verdünntesten Lösungen mit relativ stärkster Fluoreszenz nie stärker wird als die Bande bei $499\text{ m}\mu$ (Bande 2). Umgekehrt ist an Stelle der Bande 2, die in den wäßrigen Lösungen aller Konzentrationen gut zu sehen ist, in den wasserfreien Medien keine als Bande in Erscheinung tretende Verstärkung der Absorption zu erkennen. Diese Zone fällt in den wasserfreien Medien noch ganz in den Bereich der Ausläufer der starken Absorption des fluoreszenz-erregenden Lichtes. Praktisch ist also in beiden Kategorien nur eine kräftige Bande zu sehen, und da die Maxima der Banden weit auseinanderliegen und auch das Gesamtbild der Banden ziemlich charakteristisch ist, ist eine Unterscheidung der Fälle mit keinerlei Schwierigkeiten verbunden. Bei den vitalgefärbten Präparaten muß man nur eine zu starke Anfärbung, bei der die Lage der Maxima nicht mehr ermittelt werden könnte, vermeiden. Aber wenn die Färbung wirklich vital bleiben soll, darf man ja so stark gefärbte Präparate ohnehin nicht verwenden. Abgesehen hievon gilt aber das Prinzip der Unterscheidung ohne Komplikationen für alle Konzentrationsbereiche, und darin liegt eben der Vorzug des Safranins gegenüber dem Irisblau. Die verschiedene Lage der Maxima bedingt auch einen leichten Unterschied des Farbtones der wäßrigen und der wasserfreien Lösung. Beide Lösungen sind zwar rot, da ja der Hauptteil der Banden in beiden Fällen in Grün liegt, aber die wäßrige Lösung hat einen Stich in Gelb, während der Farbton der wasserfreien Lösung ein tiefes Rosa ist. Bei leicht getrübbten oder gelblichen Zellen kann man allerdings gerade mit diesen Farbünterschieden nichts anfangen.

Bei Zusatz von chromotropen Substanzen schlägt der Farbton der wäßrigen Lösungen von Rot nach Orange um. Bei Zusatz von Agar verschiebt sich dabei die Bande bis in die Gegend von 460 bis $490\text{ m}\mu$ (vgl. Abb. 1c). Die Lage des Maximums ist nicht leicht zu ermitteln. Es liegt zwischen 470 und $480\text{ m}\mu$, näher bei 480 . Genau den gleichen Farbumschlag erhält man bei Aussalzung der wäßrigen Farblösung, die sich mit NaSCN besonders schön erreichen läßt. Man erhält dabei schön durchscheinende orangefarbige Farbmassen, die im Mikrospektralphotometer eine breite Bande zwischen 460 und $490\text{ m}\mu$ mit einem Maximum etwas unterhalb $480\text{ m}\mu$ zeigen. In beiden Fällen, bei der Entstehung des dehydratisierten Komplexes von Farbstoff + Agar und bei der Entziehung des Lösungsmittels durch das Salz, wird der Farbstoff, wie ich das schon für andere metachromatische Farbstoffe wahrscheinlich gemacht habe, jedenfalls in das andersgefärbte Farbmolekül übergeführt. Darin erblicke ich die Erklärung des Farbumschlages bei der Fällungsmetachromasie (vgl. J. Spek, 1940 und 1943).

Mit einer anderen chromotropen Substanz, der synthetisch hergestellten Arabylschwefelsäure, läßt sich auch bei Safranin keine so ganz vollständige Überführung des Farbstoffes in die metachromatische Modifikation erreichen.

Das Maximum der Absorption liegt bei Arabylschwefelsäure-Safranin bei 492 m μ , und die Bande greift weiter über Grün hinüber.

Vergleicht man die drei Spektren in der Abb. 1 miteinander, so sieht man, daß sich die drei Fälle spezifischer Safraninfärbungen leicht voneinander unterscheiden lassen und jeder für sich genügend charakterisiert ist. Ob wir freilich bei Anfärbung des lebenden Protoplasmas auch dem dritten Typ der Safraninfärbung begegnen werden, ist nach allen unseren bisherigen Erfahrungen nicht sehr wahrscheinlich. Zur Entstehung einer metachromatischen Anfärbung chromotroper Substanzen gehört ja eine Ausfällung von diesen durch den Farbstoff (eine Komplexbildung zwischen chromotroper Substanz und Farbstoff), und diese tritt erst bei viel höheren Farbstoffkonzentrationen ein, als sie in der Regel bei Vitalfärbungen verwendet werden (vgl. J. Spek 1940 und 1943). Innerhalb der Zelle scheinen die chromotropen Substanzen so stark hydratisiert oder sonstwie gegen die Ausfällung geschützt zu sein, daß selbst Konzentrationen des Farbstoffes, die außerhalb der Zelle wirksam sind, wenn man sie in das Innere von Zellen, die sicher chromotrope Substanzen enthalten, injiziert, keine spezifische Anfärbung der chromotropen Substanzen im metachromatischen Farbton herbeizuführen vermögen. Nur wenn die Bedingungen für eine direkte Einwirkung des Farbstoffes auf die chromotrope Substanz der lebenden Zelle so günstig liegen wie bei den Amöben, wo eine solche Substanz (wahrscheinlich ein Mukoid) die ganze Außenfläche der Zelle überzieht, kann man auch schon an der lebenden Zelle eine metachromatische Anfärbung der betreffenden Schicht des Zellkörpers erzielen (J. Spek und G. Gillissen 1943). Mit Safranin färbt sich dieses Grenzflächenhäutchen der Amöben orangefarbig an. Andere Fälle von einer vitalen Safraninfärbung von Zellstrukturen im metachromatischen Farbton sind mir nicht bekannt geworden, aber sollten noch solche gefunden werden, so sind wir jetzt jedenfalls in der Lage, sie, wenn sie nicht zu zart sind, auf dem optischen Wege als solche zu identifizieren, und im positiven Falle stehen uns dann auch noch alle die Kontrollen mit den anderen metachromatischen Farbstoffen zur Verfügung, welche ich in der mit G. Gilissen zusammen veröffentlichten Arbeit von 1943 zusammengestellt habe. — In manchen Fällen dürfte ein Nachweis von chromotropen Substanzen im Außenmedium der Zellen von Interesse sein.

Eine Anfärbung von lebendem Protoplasma durch die ebenfalls orangefarbige Farbbase dürfte kaum vorkommen, da unterhalb eines p_H von 9,0 kein Farbumschlag durch die alkalische Reaktion zu beobachten ist. Farbton der Lösung und Lage des Bandenmaximums bleiben innerhalb dieses weiten p_H -Bereiches unverändert. Eine elektive Anfärbung rein lipophiler Substanzen (etwa Neutralfette) durch die Farbbase wird nach den Erfahrungen der Modellversuche zu schließen bei dem üblichen p_H des lebenden Protoplasmas jedenfalls sehr blaß bleiben. Wenn sie in Erscheinung treten sollten, ließe sich mit Echtneublau leicht eine Kontrollfärbung ausführen, ob wirklich lipophile Stoffe vorliegen (J. Spek 1942).

Vitalfärbungen wurden mit Safranin und den übrigen Farbstoffen an den kleinen durchsichtigen Ovarialeiern von Süßwasserfischen, an den aus den Tieren herausgeholten Speicheldrüsen von *Chironomus*larven und

an Muskeln von *Blatta orientalis* ausgeführt. Die Färbungsversuche mit Safranin lehrten, daß der Farbstoff die Phosphatide der Zellen sehr rasch anfärben muß. Es tritt schon nach kurzer Anfärbung ein Spektrum mit einer starken Bande in der Gegend von $540\text{ m}\mu$ auf, welches ganz dem Lecithinspektrum entspricht, nur meist etwas höher liegt. Früher oder später kann es dann noch zu einer fortschreitenden Anfärbung hydrophiler Substanzen (wohl der Eiweißkörper) kommen, bei der die für die wäßrigen Lösungen charakteristische tiefer gelegene Bande (nach der Kundtschen Regel etwas nach Rot bis in die Gegend von $503\text{ m}\mu$ verschoben) zu der Phosphatidbande hinzukommt. Einzelbeobachtungen machten es sehr wahrscheinlich, daß die Anfärbung der hydrophilen Substanzen erst eintritt, wenn die Zellen sich schon nicht mehr in ganz einwandfreiem Zustand befinden. So konnte in mehrmals mit großer Sorgfalt wiederholten Versuchen mit Ovarialeiern von *Leuciscus rutilus* festgestellt werden, daß am ersten Tag der Färbungen einzelne Eier übermäßig stark und in mehr zinnoberrotem Farbton gefärbt waren, die neben der charakteristischen Phosphatidbande auch die Wasserbande zeigten, welche allmählich ebenso stark wurde wie Bande 1. In diesen Eizellen waren die Kerne stets etwas geschrumpft und das Plasma z. T. lokal von der Membran abgehoben. Alle anderen Eier zeigten pralle Kernbläschen, normales Aussehen des Protoplasmas und waren alle gleichmäßig blaßrosa gefärbt. Ihr Spektrum zeigte durchwegs nur die obere Bande, die zwischen 530 und $545\text{ m}\mu$ lag. Bei längerer Dauer des Versuches nahm die Zahl der Eier, die einen zinnoberroten Farbton annahmen und auch Bande 2 zeigten, immer mehr zu, bis schließlich die Färbung bei allen Eiern diese Merkmale zeigte. Auch bei Aufbewahrung der Objekte im Eisschrank empfiehlt es sich, die Vitalfärbungen nicht länger als 48 Stunden fortzuführen. Vielleicht wird es später, wenn mehr empirisches Material vorliegt, möglich sein, das Fehlen oder Vorhandensein der Bande 2 der Safraninfärbung als Index für die früher oder später einsetzenden Alterationen des Zustandes isolierter Zellen zu verwenden.

Bei den ausgeführten Färbungen lagen die Banden, wie Tab. 1 zeigt.

Tab. 1. Vitalfärbungen mit Safranin T.

Ovarialeier von <i>Barbus fluviatilis</i> nach 24 Std.	Ovarialeier von <i>Leuciscus rutilus</i> nach 48 Std.	Ovarialeier von <i>Lucioperca sandra</i> (Swinemünde) nach 24 Std.	Speicheldrüsen von <i>Chironomus</i> larven nach 24 Std.
Deutliche Bande bei $538-548\text{ m}\mu$. Gelbgrün aufgehell (Fluoreszenz!). Von der Bande abwärts allmählich abnehmende diffuse Verdunkelung bis Violett.	Deutliche Bande von $530-545\text{ m}\mu$. Schwächere Bande bei $503\text{ m}\mu$.	Deutliche Bande bei $540\text{ m}\mu$.	Mäßig starke Anfärbung, gut erkennbare Bande bei $540\text{ m}\mu$. Schwache Verstärkung bei $503\text{ m}\mu$.

Bei den genannten Objekten waren die mit Safranin T angefärbten Phosphatide gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt.

Beinmuskeln von *Blatta orientalis* zeigten nur eine schwache Verdunkelung zwischen 530 und 540 m μ . Auch mit anderen Farbstoffen war bei diesem Objekt nur eine sehr schwache oder gar keine Phosphatidfärbung zu erreichen.

Im Dunkelfeld tritt die gelbgrüne Fluoreszenz der mit Safranin angefärbten Zellen oder toten Modellsubstanzen nur wenig hervor. Sie wird überdeckt von der ziemlich kräftigen roten Eigenfarbe der angefärbten Objekte. In diesem Punkt liegen die Verhältnisse bei Safranin wesentlich weniger günstig als bei Irisblau, bei dem die Fluoreszenz absolut viel stärker ist, während die Färbungen, sofern es sich um Phosphatidfärbungen handelt, stets sehr blaß bleiben.

Versuche mit anderen Safraninen

Von den übrigen Safraninen, die untersucht wurden, bieten Phenosafranin und Rhodulinviolett für die praktische Unterscheidung der beiden Haupttypen von Protoplasmasubstanzen weniger günstige Verhältnisse, und über einige bei den Färbungen aufgetauchte neue Fragen läßt sich auf Grund des bis jetzt vorliegenden Materials noch kein sicheres Urteil fällen. Im Prinzip liegen aber die Dinge, die uns hier interessieren, bei ihnen ebenso wie beim Safranin selbst.

Trotzdem die beiden Farbstoffe chemisch ziemlich verschieden sind, weisen sie viele gleiche Merkmale auf. Die Löslichkeitsverhältnisse sind ähnlich wie bei Safranin. In Wasser und Alkohol sind die Farbstoffe gut löslich. Xylol färbt sich aus schwach alkalischen Lösungen kaum merklich an. Auch frisches Fett (Hammelfett) bleibt in solchen Lösungen ungefärbt. Ranziges Fett dagegen färbt sich stark an, in Rhodulinviolett violettrosa, in Phenosafranin rosa. Die hydrophile COOH-Gruppe der abgespaltenen Fettsäure verändert die Löslichkeitsverhältnisse des Fettes vollständig. Phosphatide färben sich in Rhodulinviolett und Phenosafranin rasch und stark an. Bei beiden Farbstoffen ist die Fluoreszenz in wasserfreien Lösungen viel stärker als in Wasser oder rein hydrophilen Substanzen. Dementsprechend ist die einzige Bande, die in beiderlei Lösungen zu sehen ist, in den wasserfreien Medien (in den Phosphatiden auch bei Gegenwart von Wasser) viel dunkler und schärfer als in Wasser.

In lebenden Zellen dringen die Farbstoffe ein. Am ersten Tag ist die Färbung meist ziemlich blaß.

Die genaueren Daten, die uns hier interessieren, sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Beide Farbstoffe sind metachromatisch. Bei Zusatz von Agar verschwindet bei beiden die in Spalte 3 der Tab. 2 beschriebene Wasserbande fast vollständig, und es tritt eine neue schwache Bande in Violett auf.

Würden nun bei den Vitalfärbungen Banden auftreten, deren Maxima entweder ungefähr dem der Wasserbande oder dem der Lecithinbande entsprächen, so wäre eine sichere Entscheidung, welcher Typ von Färbung vor-

liegt, infolge der großen Nähe der Maxima recht schwierig. Dazu kommt, daß ja beide Werte in den stärker lichtbrechenden Protoplasmasubstanzen im Sinne der Kundtschen Regel etwas nach Rot verschoben würden, wobei die Erfahrung gelehrt hat, daß der Betrag dieser Verschiebung bei den verschiedenen Zellen und verschiedenen Farbstoffen in noch nicht klar übersichtbarer Weise ziemlich stark variieren kann. Überraschenderweise ergab sich nun aber für beide Farbstoffe in gleicher Weise bei Vitalfärbungen an recht verschiedenartigem Zellmaterial eine über die sonst beobachteten Abweichungen noch weit hinausgehende, starke Verschiebung des Bandenmaximums nach Rot bis in die Gegend von 570—580 $m\mu$. Das wäre also ein Wellenlängenbereich, der um ungefähr 30 $m\mu$ über dem Maximum der wäßrigen

Tab. 2. Fluoreszenz und Spektren von Phenosafranin und Rhodulinviolett.

Farbstoffe	Fluoreszenz	Spektrum in Wasser	Spektrum in abs. Alkohol	Spektrum in Lecithin
Phenosafranin	Gelbgrüne Fluoreszenz in Alkohol viel stärker als in Wasser.	Eine sehr breite diffuse, blasse Bande in Grün. Max. ca. 545 $m\mu$.	Scharfe dunkle Bande um 542—553 $m\mu$. Max. bei 548 $m\mu$.	Oberer Rand der Bande verstärkt. Max. ca. 553 $m\mu$.
Rhodulinviolett	In Alkohol starke grünbraune Fluoreszenz. In Wasser minimal.	Sehr verwaschene Bande, im oberen Grün. Max. ca. 546 $m\mu$.	Kräftige, scharfumrissene Bande. Max. bei 550 $m\mu$.	Kräftige Bande. Max. bei 550 $m\mu$.

Lösungen liegt und auch um fast den gleichen Betrag höher liegt als das Maximum der Lecithinbande. Ob es Phosphatide gibt, welche auch im Modellversuch bei Anfärbung mit den beiden Farbstoffen eine so starke Rotverschiebung der Bande zeigen, müssen erst künftige Versuche lehren, bisher konnte ich keines finden. Ein Vergleich mit den Verhältnissen bei Safranin und den weiter unten zu beschreibenden Farbstoffen zeigt auch, daß bei ihnen die Abweichung der in den angefärbten Zellen beobachteten Bandenmaxima von denen des Lecithins nirgends so groß ist, ja daß bei einigen Farbstoffen gegenüber Lecithin sogar eine Differenz nach der anderen Seite vorliegt. Man wird daher geneigt sein, noch einen anderen Faktor zu suchen, welcher auf die Rotverschiebung der Banden einen Einfluß hat. Ich möchte diese Diskussion erst wieder aufnehmen, wenn mehr Beobachtungsmaterial vorliegt.

Rhodulinviolett und Phenosafranin zeigen beide das Phänomen der Verschiebung des Bandenmaximums nach Violett bis an die Stelle des Absorptionsmaximums des molekularen Farbstoffes in wäßrigen Lösungen steigen der Konzentration auf das Auffälligste. Die Verschiebung kommt dann zustande, wenn der dissoziierte und molekulargelöste Farbstoff ein verschiedenes Absorptionsmaximum (und damit meist auch eine verschiedene Farbe) haben und wenn die beiden Absorptionskurven einander stark überschneiden. L. Lison hat 1935 als erster bei den metachromatischen Farb-

stoffen auf die Erscheinung aufmerksam gemacht, sie aber etwas anders gedeutet und bei den Farbstoffen, die mehrere verschiedenartige Banden besitzen, in nicht ganz zutreffender Weise dargestellt (vgl. J. Spek 1940, S. 558 ff.). Bei Rhodulinviolett hat eine 0,01%ige Lösung bei 20° C noch ein Bandenmaximum bei 546 $m\mu$, eine 0,02%ige schon bei 530 $m\mu$, eine 0,04%ige bei 523 $m\mu$, und bei ganz konzentrierten Lösungen rückt es schließlich noch weiter bis ins Violett herunter. Je höher die Konzentration der Farbsalzmoleküle wird, um so mehr nähert sich das Absorptionsmaximum dem des ausgesalzenen Farbstoffes (493 $m\mu$).

Schließlich sei noch erwähnt, daß in Lösungen von Phenosafranin in Ölsäure, welche sich als Substanz mit lipophilen + hydrophilen Eigenschaften ebenfalls anfärbt, die zunächst erscheinende kräftige Bande zwischen 530 und 560 $m\mu$ allmählich immer blasser wird und daß statt dessen eine zweite bei 522 $m\mu$ gelegene Bande auftritt. Die Veränderung des Farbstoffes ist vielleicht auf eine teilweise Reduktion zurückzuführen, denn bei längerem Stehen entfärbt sich die Ölsäurelösung. Auch in naszierendem Wasserstoff wird der Farbstoff durch Reduktion völlig entfärbt. In ähnlicher Weise zeigt Rhodulinviolett in Ölsäure und ranzigen Fetten zwei Banden, eine etwas höher als bei Lecithin, nämlich bei 551 $m\mu$, und eine zweite bei 522 $m\mu$. Eine Identifizierung von Fetten oder Ölen, die ungesättigte Fettsäuren enthalten, könnte auch für den Cytologen bisweilen von Interesse sein.

Von den untersuchten Safraninen zeigt noch Brillantrhodulinrot B von den Gesichtspunkten der cytologischen Technik sehr beachtenswerte Eigenschaften. Der Farbstoff ist verwandt mit Brillantrhodulinviolett. Er ist in Wasser schwach grüngelb fluoreszierend, in absolutem Alkohol und anderen wasserfreien Medien ist die Fluoreszenz wiederum beträchtlich stärker. Eine Lösung erfolgt nur in rein hydrophilen und in hydrophilen + lipophilen Medien. Lecithin und andere Phosphatide sind stark färbbar, in Xylol und neutrales Hammelfett geht der Farbstoff nicht hinein. Ranziges Fett färbt sich blaß-gelblich-rosa an.

In Alkohol und in angefärbtem Lecithin ist in jedem Konzentrationsbereich eine sehr dunkle Bande zu sehen, die nach oben scharfrandig begrenzt ist, nach Violett dagegen ganz allmählich ausläuft. Das Absorptionsmaximum liegt in Alkohol bei 548, in pflanzlichem Lecithin bei 562 $m\mu$. Über der Bande ist in Grün und Gelb eine starke Aufhellung zu sehen (Fluoreszenzlicht!). In verdünnten wäßrigen Lösungen gleicher Konzentration ist die der Alkohol- bzw. Lecithinbande entsprechende Bande viel schwächer und schmaler, über ihr ist aber in Grün und Gelb auch hier eine deutliche Aufhellung zu sehen. Abb. 2 ist eine Darstellung der Banden sehr verdünnter Lösungen gleicher Konzentration, a) in Wasser, b) in absolutem

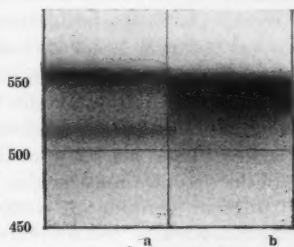


Abb. 2. a) Spektrum von Brillantrhodulinrot B. in Wasser. b) Spektrum des Farbstoffes in absolutem Alkohol.

Alkohol, die bei 4 mm Schichthöhe nach dem subjektiven Eindruck gezeichnet wurde. Sie zeigt, daß in Wasser die erwähnte Bande (die obere der beiden Banden der Abb. 2a) unvergleichlich schwächer ist als die breite Bande der alkoholischen Lösung und daß ihr Maximum etwas höher, und zwar bei 552 $m\mu$, liegt. Das Bemerkenswerteste aber ist an dem Wasserspektrum, daß es zwei Banden zeigt. Das Maximum der unteren Bande liegt bei 512 $m\mu$. Einfache Versuche mit Konzentrationsserien klären uns über den verschiedenen Charakter der beiden Banden auf. Während nämlich die untere Bande bei 512 $m\mu$ in den sehr verdünnten wäßrigen Lösungen nur ganz zart und viel schwächer ist als die Bande bei 552, wird sie bei Konzentrationserhöhung viel dunkler als die obere Bande, deren Stärke in hohen Konzentrationen abnimmt. In Deckglaspräparaten 0,5%iger Lösungen sieht man die obere Bande noch, die untere aber ist unvergleichlich dunkler und breiter. Da Brillanthodulinrot B ein metachromatischer Farbstoff ist, also anders gefärbte Moleküle haben dürfte, ist wohl die Bande bei 512 $m\mu$ im wesentlichen als Bande des Farbions aufzufassen. Sie tritt entsprechend der schwächeren Dissoziation des Farbstoffes in Alkohol in diesem nicht als selbstständige Bande in Erscheinung, ist wohl überlagert von dem Ausläufer der starken Bande bei 548 $m\mu$. Die obere Bande der wäßrigen Lösung verhält sich im wesentlichen wie eine Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes.

In sehr verdünnten wäßrigen Lösungen ist die Bande bei 512 $m\mu$ im Engelmanschen Mikrospektralphotometer nicht mehr zu erkennen. Der Farbton dieser blassen Lösungen ist aber in der Schichtdicke mikroskopischer Präparate nicht mehr zu sehen, so daß sie bei Vitalfärbungsstudien nicht mehr in Betracht gezogen zu werden brauchen. Für alle anderen bei der Vitalfärbung in Frage kommenden Konzentrationsbereiche gilt, daß das Spektrum des Farbstoffes in Wasser und hydrophilen Substanzen stets zwei Banden aufweist, während das Phosphatidspektrum nur eine kräftige Bande zeigt. Die Unterscheidung der beiden Haupttypen der Färbung gestaltet sich daher bei Brillanthodulinrot B äußerst einfach.

Daß das Maximum der Alkoholbande etwas tiefer liegt als das der oberen Wasserbande, braucht nicht unbedingt gegen die Kundsche Regel zu sprechen, nach der man bei Alkohol eine Verschiebung der Banden nach Rot erwarten müßte. Eine Verschiebung der Banden des fluoreszenzerregenden Lichtes kann auch dadurch zustande kommen, daß die maximale Erregung der Fluoreszenz der Farbstoffe in den Medien verschiedener physikalischer Beschaffenheit nicht bei der gleichen Wellenlänge erfolgt.

Brillanthodulinrot B dringt in die lebenden Zellen ein. Es färbt das Protoplasma ziemlich langsam an. Färbungen von Ovarialeiern von *Leuciscus rutilus* und von Speicheldrüsen von *Chironomus*-Larven waren am ersten Tag noch ziemlich blaß, wurden aber dann am zweiten doch schon intensiv genug, um die Banden im Engelmanschen Mikrospektralphotometer aufs schärfste hervortreten zu lassen. Bei beiden Objekten trat dabei nur eine kräftige Bande auf. Sie lag bei den *Leuciscus*-Eiern zwischen 540 und 555 $m\mu$ mit dem Maximum bei 552, bei den Speicheldrüsen von *Chironomus*-Larven bei 548 $m\mu$. Auch wenn man die Färbung so lange fortführte, bis

die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes sehr kräftig wurde, trat keine zweite Bande hervor, die der unteren Bande des Wasserspektrums entsprochen hätte. Von der starken Bande abwärts war Grün und Blau mittelstark verdunkelt. In Violett verlor sich die Verdunkelung allmählich. Es lag also offensichtlich eine Phosphatidfärbung vor, die so wie alle anderen Phosphatidfärbungen bei diesen Objekten in allen Teilen des Protoplasmas gleich stark auftrat.

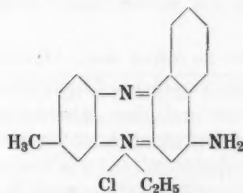
Schädigende Wirkungen des Farbstoffes waren nicht zu beobachten. Die kleinen Ovarialeier der Fische blieben auch bei starker Anfärbung in tadellosem Zustand erhalten. Die Kerne schrumpften nicht.

Brillanthodulinrot B ist ein schwach metachromatischer Farbstoff. Mit Agar gelang es mir nicht, einen Farbumschlag oder eine Änderung des Spektrums herbeizuführen. Bei Zusatz von Arabylschwefelsäure dagegen wurde die Bande der wäßrigen Lösung bei $512\text{ m}\mu$ beträchtlich abgeschwächt und verwaschen. Statt dessen trat eine neue schwache Bande bei $482\text{ m}\mu$ auf. Die Bande des fluoreszenzerregenden Lichtes blieb unverändert erhalten. Ein neuer Beweis für die verschiedene Natur der beiden Banden!

Deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzstärke wäßriger und alkoholischer Lösungen habe ich noch bei den Safraninen Irisviolett, Magdalarot und Indazin beobachtet. Bei Indazin ist die orangegelbe Fluoreszenz auch in Alkohol schwach, in der wäßrigen Lösung, die zudem auch noch ein weißliches Tyndalllicht zeigt, ist sie kaum zu erkennen. Die anderen beiden Farbstoffe sind kräftig fluoreszierend, da sie aber gegenüber den oben beschriebenen keinerlei Vorteile zu bieten schienen, habe ich an ihnen keine eingehenden Untersuchungen angestellt. Erwähnt sei nur noch, daß Indazin ein metachromatischer Farbstoff ist.

Versuche mit Aposafraaninen

Die Aposafraanine unterscheiden sich von den Safraninen dadurch, daß an einem der durch die beiden Stickstoffatome miteinander verbundenen Benzolringe oben noch ein dritter Benzolring sitzt. Besonders viele Versuche habe ich mit dem Aposafraanin Indulinscharlach ausgeführt. Indulinscharlach hat die Strukturformel:



Der Farbstoff ist leicht löslich in Wasser und in Alkohol. Xylol färbt sich beim Ausschütteln neutraler oder schwach alkalischer Farblösungen gelblichrot. Aus stark alkalischen Lösungen läßt sich der Farbstoff mit Xylol vollständig ausschütteln. Die in das Xylol übergehende Farbbase hat die gleiche Farbe und das gleiche Spektrum wie das Farbsalz. Frisches Hammelfett färbt sich nur blaß, säurehaltiges sehr stark gelblichrot an. Auch Lecithin

färbt sich rasch und stark an. An lebenden Zellen und Geweben lassen sich mit Indulinscharlach sehr schöne Vitalfärbungen erzielen.

Der Farbstoff hat eine gelbe Fluoreszenz. Sie ist in Wasser nur schwach, in Alkohol viel stärker. Die wäßrigen Lösungen zeigen nur eine verwaschene breite Bande, deren Maximum bei $497\text{ m}\mu$ liegt. Violett und Blau sind mittelstark verdunkelt. Über Grün geht eine mittelstarke Verdunkelung bis in die Gegend von 540 oder $550\text{ m}\mu$ (vgl. Abb. 3 a). Ganz anders sieht das Bild des Spektrums von der alkoholischen Lösung aus. Hier sind in verdünnten Lösungen gleicher Konzentrationen zwei scharfe dunkle Banden zu sehen (Abb. 3 b). In bezug auf die Zahl der Banden liegen also die Verhältnisse umgekehrt als bei Brillantrhodulin-

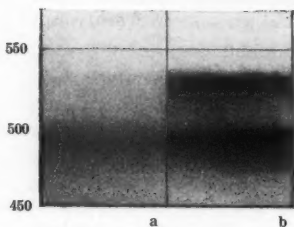


Abb. 3. a) Spektrum von Indulinscharlach in Wasser, b) in absolutem Alkohol.

rot, wo die wäßrigen Lösungen zwei, die alkoholische nur eine Bande aufwies. In bezug auf die Absorptionsstärke der beiden Typen von Lösungen stimmen die beiden Farbstoffe überein. Bei beiden sind die Banden der alkoholischen Lösungen unvergleichlich dunkler und schärfer.

Das Maximum der oberen Bande der alkoholischen Lösung (Bande 1) liegt bei $532\text{ m}\mu$, das der unteren Bande (Bande 2) an der gleichen Stelle wie in Wasser, nämlich bei $497\text{ m}\mu$. In der Höhe von Bande 1 der alkoholischen Lösung ist in Wasser bei hoher Schichtdicke eine ganz schwache Verstärkung der Absorption zu erkennen. Bei geringerer Schichtdicke tritt sie nicht hervor. Das Bild des Spektrums bleibt

bei den Lösungen in Wasser bei allen Konzentrationen das gleiche. In Alkohol ist in mittleren und hohen Konzentrationen die untere Bande bei 497 dunkler als die obere. In sehr verdünnten Lösungen läßt sich dieser Unterschied nicht mehr nachweisen, d. h. die beiden Banden erscheinen gleich stark, müssen also bei Verdünnung verschieden stark abgenommen haben. Es dürfte demnach ein geringfügiger qualitativer Unterschied der beiden Banden vorliegen.

Die ganzen Unterschiede zwischen dem Alkohol- und dem Wasserspektrum auf die im Alkohol sehr verstärkte Fluoreszenz zurückzuführen, dürfte verfehlt sein. Ein Vergleich mit dem überhaupt nicht fluoreszierenden Aposafrafin Azokarmine lehrt nämlich, daß auch bei diesem Farbstoff zwei ganz ähnlich gelagerte Absorptionsmaxima in Grün vorkommen und daß der ganze Wellenlängenbezirk mittelstark verdunkelt ist. In Alkohol sind die beiden Banden annähernd gleich stark, in Wasser ist die obere schwächer als die untere. Das verschiedene Lösungsmittel bewirkt also hier, auch wenn keine verschieden starke Absorption des fluoreszenzerregenden Lichtes hinzukommt, schon eine gewisse Verschiedenheit der Spektren. Bei den fluoreszierenden Farbstoffen kommt dann hiezu noch eine Verstärkung der Lichtabsorption in den Wellenlängenbezirken des fluoreszenzerregenden Lichtes

hinzu, und wenn diese in zwei Medien so sehr verschieden ist wie bei Wasser und Alkohol, dann kommen so außerordentliche Verschiedenheiten der Spektren zustande, wie sie in Abb. 5a und b von einer verdünnten wäßrigen und alkoholischen Lösung gleicher Konzentration dargestellt sind. Bei Azokarmin sind die beiden Banden auch in Alkohol so blaß und verwaschen wie in Wasser, treten in der diffusen Verdunkelung im unteren Grün kaum als Banden hervor, und von den regionalen Differenzen abgesehen ist im ganzen die Absorption in Alkohol kaum stärker als in Wasser. Darin unterscheidet sich der nichtfluoreszierende von dem fluoreszierenden Farbstoff.

Die Farbe der verdünnten wäßrigen Lösungen von Indulinscharlach ist scharlachrot, die der alkoholischen mehr orange. In dünnen Schichten ist kein Farbunterschied zu erkennen. In den Phosphatiden treten, wenn man sie mit der wäßrigen Farblösung überschichtet, so wie in absolutem Alkohol zwei Banden auf, die, wie in der Regel, etwas höher liegen als im Alkohol. In pflanzlichem Lecithin liegen die Maxima bei 545 und 504 $m\mu$, in ranzigem Schweinefett bei 552 und 512 $m\mu$. Ranzige Fette verhalten sich immer wie lipophile + hydrophile Substanzen.

Bei Vitalfärbungen ist die Unterscheidung von „Phosphatidspektrum“ und „Wasserspektrum“ denkbar einfach. Für alle Konzentrationen gilt, daß das Phosphatidspektrum zwei Banden haben muß, während das Wasserspektrum nur eine Bande aufweist. Die Deutung der Ergebnisse der Vital-

Tab. 5. Vitalfärbungen mit Indulinscharlach.

Ovarialeier von <i>Leuciscus rutilus</i>	Ovarialeier von <i>Lucioperca sandra</i> (Swinemünde)	Speicheldrüsen von <i>Chironomus</i> -Larven
Färbung scharlachrot. Zwei schöne, kräftige Banden zu sehen. Bande 1 Max. 542 $m\mu$, Bande 2 Max. 504 $m\mu$, Bande 2 kräftiger. Auch Grünblau, Blau und Blauviolett ziemlich verdunkelt. Stärker als Feld zwischen den Banden. Eier tadellos erhalten.	Zwei Banden. Bande 1 540—552 $m\mu$, Max. 544 $m\mu$, Bande 2 498—512 $m\mu$, Max. 505 $m\mu$, Bande 2 kräftiger.	Zwei kräftige Banden. Bande 1 Max. 545 $m\mu$, Bande 2 Max. 505 $m\mu$. Untere Bande kräftiger, greift nach Blauviolett über. Auch Feld zwischen den Banden verdunkelt.
Suspension von <i>Ascites</i> -Carcinomzellen der Maus	Nervus ischiadicus von <i>Rana esculenta</i>	Muskulatur von <i>Blatta orientalis</i>
Suspension erscheint en masse scharlachrot. Zwei starke Banden zu sehen. Bande Max. ca. 542 $m\mu$, Bande 2 Max. ca. 502—505 $m\mu$. Nicht einzelne Zellen eingestellt.	Deutliche scharlachrote Anfärbung. Zwei unscharfe, breite Banden sichtbar. Das ganze Feld zwischen 490 und 552 $m\mu$, mittelstark verdunkelt. Bande 1 Max. 545 $m\mu$, Bande 2 Max. 505 $m\mu$, Bande 2 wesentlich kräftiger.	Nur eine breite Bande von Mitte Grün bis Violett. Deutliche Verstärkung zwischen 485 und 500 $m\mu$, Max. ca. 497 $m\mu$.

färbungen, die an verschiedenartigstem Material ausgeführt wurden, bereitet daher keine Schwierigkeiten. Das Wichtigste davon ist in Tab. 3 zusammengestellt.

Zu den mitgeteilten Werten sei noch bemerkt, daß Unterschiede von einigen $m\mu$ bei Messungen mit dem Engelmanschen Mikrospektralphotometer noch in die Fehlergrenze fallen. Die Skala gibt Werte von 10 zu 10 $m\mu$ an. Die Lage der dazwischenliegenden Maxima muß geschätzt werden.

Bei Nerven müssen die Nervenfasern zwecks Anfärbung gelockert werden. Wegen der vielen reflektierenden Flächen gibt dieses Objekt auch bei Anfärbung mit anderen Farbstoffen stets unscharfe Banden.

Abweichend von allen anderen Objekten zeigt die Muskulatur von *Blatta orientalis* eine reine „Wasserbande“. Der Farbstoff muß also in den Eiweißkörpern oder anderen rein hydrophilen Substanzen sitzen. Es wurde schon erwähnt, daß auch andere Farbstoffe bei diesem Objekt nur eine sehr schwache oder gar keine Lipoidfärbung geben.

Weder Indulinscharlach noch Azokarmin geben mit chromotropen Substanzen metachromatische Umschläge. — Azokarmin wird von den physiologischen Medien ausgeflockt. Es färbt lebende Zellen nicht an.

Zusammenfassung

Auch unter den basischen Safraninen und Aposafraninen gibt es eine ganze Reihe von Farbstoffen, welche so wie Irisblau und die anderen von mir beschriebenen Oxazine in wasserfreien organischen Lösungsmitteln viel stärker fluoreszieren als in Wasser und dementsprechend eine viel stärkere Absorptionsbande des fluoreszenzerregenden Lichtes zeigen als in wäßrigen Lösungen. Meist handelt es sich um eine grüne oder gelbgrüne Fluoreszenz, und die am stärksten erregenden Wellenlängenbereiche liegen im sichtbaren Teil des Spektrums. Auch außer dieser Differenz können noch charakteristische Unterschiede zwischen dem Spektrum der wäßrigen und der wasserfreien Lösung vorhanden sein.

In rein lipophilen Medien löst sich das Farbsalz der Farbstoffe nicht, es ist nur in lipophilen + hydrophilen und in den rein hydrophilen Substanzen gut löslich. In niedermolekularen lipophilen + hydrophilen Stoffen verschwindet die starke Fluoreszenz bei Wasserzusatz wieder. In den hochmolekularen lipophilen + hydrophilen Stoffen bleibt sie auch bei Wasserzusatz erhalten, weil die Farbstoffe an den großen lipophilen Gruppen offenbar genügend große wasserfreie Orte finden, wo ihre Fluoreszenz nicht gehemmt wird. Nach bisherigen Ergebnissen der Modellversuche sind es unter den Bedingungen in der Zelle die Phosphatide allein, welche die Fluoreszenzsteigerung und das „Phosphatidspektrum“ zeigen. Das Verhalten der Farbstoffe in Fetten, welche Fettsäuren oder andere lipophile + hydrophile Stoffe enthalten, wurde besonders berücksichtigt.

Ein Vorzug der Safranine und Aposafranine gegenüber Irisblau besteht darin, daß die Unterschiede zwischen „Wasserspektrum“ und „Phosphatidspektrum“ für alle bei der Vitalfärbung praktisch in Frage kommenden Konzentrationsbereiche gelten.

„Wasserspektrum“ und „Phosphatidspektrum“ sind besonders leicht zu unterscheiden, wenn die Maxima der Hauptbanden in den beiden Fällen weit auseinanderliegen (wie etwa bei Safranin) oder wenn ein Spektrum zwei, das andere dagegen nur eine Bande zeigt, wie bei Brillanthodulinrot und Indulinscharlach.

Unter den Safraninen gibt es zahlreiche metachromatische Farbstoffe, die mit chromotropen Substanzen einen Farbumschlag geben. Sitzt der Farbstoff in einer solchen Substanz, so gibt er wiederum ein charakteristisch anderes Spektrum. Die Bande von diesem liegt zwar an der gleichen Stelle wie die der Farbbase, doch dürfte bei Vitalfärbungen eine Anfärbung durch die Farbbase wegen des hohen Umschlagpunktes der Farbstoffe und wegen des bei niedriger Alkalinität nur sehr geringfügigen Übertrittes der Farbbase in lipophile Substanzen kaum vorkommen.

Die untersuchten Farbstoffe fluoreszieren viel schwächer als Irisblau. Eine Unterscheidung der verschiedenen Typen der Färbung durch die verschiedene Intensität des Fluoreszenzlichtes im Dunkelfeld ist bei den Safraninen und Aposafraninen nicht möglich.

Safranin T, Brillanthodulinrot B, Rhodulinviolett, Phenosafranin und Indulinscharlach sind zu Vitalfärbungen sehr gut zu verwenden. Sie sind ungiftig. Die schönsten Vitalfärbungen erhielt ich mit Indulinscharlach.

Auch die Versuche mit den Safraninen und Aposafraninen lehren in eindringlicher Weise, daß die Farbstoffe in rein lipophilen und in lipophilen + hydrophilen Substanzen sehr verschieden löslich sind. Alle Lipoidtheorien kranken sehr daran, daß diese Unterscheidung nicht gemacht worden ist.

Die Spektren von den vitalgefärbten Zellen wurden mit dem Engelmannschen Mikrospektralphotometer entworfen. Die Bestimmung der Maxima der Absorptionsbanden ist mit dem Engelmannschen Mikrospektralphotometer nicht mit solcher Sicherheit zu erreichen wie mit einem großen Spektroskop. Es ist möglich, daß sich dadurch geringfügige Fehler ergeben haben. Da es aber bei den biologischen Betrachtungen ausschließlich auf die Differenzen in der Lage der Maxima zweier Spektren ankommt und diese bei den bevorzugten Farbstoffen sehr weit auseinanderliegen, habe ich nur z. T. Kontrollen mit großen Apparaten ausgeführt.

Literatur

- Lison, L.: *Archiv de Biol.* 46, 599—669 (1935).
Schultz, G.: *Farbstofftafeln*, 7. Aufl., Leipzig 1931.
Spek, J.: *Protoplasma* 34, 533—584 (1940). Hier ältere Literatur über Metachromasie. 37, (49—85) (1942). Hier ältere Literatur über Lipoidfärbungen. *Jenaische Zeitschrift* 77, 48—67 (1944).
Spek, J., und Gillissen, G.: *Protoplasma* 37, 258—272 (1945).

Apfelgas-Wirkung auf Stomatazahl

Von

Maria Kropfitsch

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. Januar 1951)

Es ist schon länger bekannt, daß reifende Äpfel ein Gas aushauchen, das auf pflanzliche Organismen verschiedenartige Wirkungen ausübt. In erster Linie wurde auf makroskopisch erkennbare Effekte (Änderungen des Habitus und physiologische Vorgänge) geachtet, die das Apfelgas (Äthylen) hervorruft (Molisch 1937, Avery and Johnson 1947, Laibach und Fischnich 1950, Paech 1950).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Apfelgases auf die Differenzierung der Epidermis des Blattes und insbesondere auf die Ausbildung der Spaltöffnungen studiert. Versuchspflanze war ausschließlich *Vicia Faba*.

Versuchsmethode

Keimlinge von *Vicia Faba* wurden im Glashaus unter Glasstürzen von ca. 5000 cm³ Rauminhalt (abzüglich Volumen des Blumentopfes: 4050 cm³) gezogen. Eine Gruppe blieb jeweils zur Kontrolle in reiner Luft, während der zweiten Gruppe, dauernd oder zeitweise, 3 bis 6 Äpfel beigegeben wurden. Es ist offenbar unwesentlich, welche Apfelsorte verwendet wird, bei den meisten Versuchen waren Äpfel der Sorte „Baumann-Reinette“ die Gasspender.

Die angegebenen Durchschnittswerte wurden jeweils aus ca. 60 Einzelwerten von 15 Keimlingen errechnet.

Versuchsergebnisse

1. Die Wirkung stark verdünnter Apfelloft auf Keimlinge von *Vicia Faba*.

Im Zuge umfangreicher Untersuchungen stellte Molisch (1937) fest, daß das von den Äpfeln abgegebene Gas, in verdünnter Form oder bei verhältnismäßig kurzer Einwirkungsdauer, keine Hemmung des Längenwachstums, sondern eine deutliche Förderung bewirkt. Dies bestätigte sich für Keimlinge von *Vicia Faba*, die täglich einige Stunden hindurch der Exhalation von drei Äpfeln ausgesetzt waren. Neben dieser Begünstigung des Längenwachstums ließ sich eine allerdings nur unwesentliche Beein-

flussung der Blattentwicklung und des Blattspreitenwachstums beobachten. Bei allen untersuchten Blättern war keine Veränderung der Spaltöffnungszahl gegenüber den Kontrollblättern festzustellen und keine auffallende Häufung anormaler Stomatabildungen. Stark verdünnte „Apfelloft“, die eine Förderung des Längenwachstums bewirkt, beeinflusst also die Differenzierung der Blattepidermis und die Entwicklung der Spaltöffnungen offenbar nicht.

2. Verhalten der Keimlinge bei dauerndem Verweilen in Apfelloft (drei Äpfel).

Alter der Keimlinge: 20 Tage (gerechnet vom Tage der Aussaat).

Dauer der Apfelloftbehandlung: Kontinuierlich 10 Tage lang (vom Augenblicke an, wo die Sproßspitze der Keimlinge über dem Erdboden erschien).

Die in Gegenwart der Äpfel gezogenen Keimlinge erfuhren sowohl in ihrem Längenwachstum als auch in ihrer Blattentwicklung eine bedeutende Hemmung und hatten zu Beginn der anatomischen Untersuchung ungefähr die halbe Sproßlänge der Kontrollpflanzen erreicht. Die Internodien waren stark verdickt, mitunter um das Doppelte eines normalen Durchmessers. Die unter dem Einfluß des Apfelloftes stehenden Keimlinge hatten sehr kleine, stark epinastisch gekrümmte, intensiv grün gefärbte, lackglänzende Laubblätter in geringerer Zahl als die gleich alten Kontrollen.

Die Differenzierung der Epidermis und Ausbildung der Stomata erfuhren unter der Einwirkung des Apfelloftes während der Blattentwicklung eine sehr beachtliche Beeinflussung: Es fiel auf den ersten Blick eine beträchtliche Vermehrung der Spaltöffnungszahl pro Quadratmillimeter auf. Die einzelnen Sto-

Tabelle 1.

Größenverhältnis	In Apfelloft	Kontrolle
Sproßlänge	7,3 cm	16,9 cm
Sproßquerschnitt . . .	0,5 cm	0,35 cm
Blattgrößen:		
1. Primärblatt	4,7 cm ²	17,2 cm ²
2. Primärblatt	2,5 cm ²	11,5 cm ²
Blattspreitenlängen:		
1. Primärblatt	2,1 cm	4 cm
2. Primärblatt	1,7 cm	3,5 cm

Tabelle 2.

Stomatazahl	In Apfelloft	Kontrolle
Stomata pro Quadratmillimeter:		
1. Primärblatt {Oberseite	254	40
{Unterseite	371	59
2. Primärblatt {Oberseite	409	72
{Unterseite	522	113
Stomata pro Blattfläche:		
1. Primärblatt {Oberseite	119.380	68.800
{Unterseite	174.370	101.480
davon unfertige Entwicklungsstadien:		
1. Primärblatt {Oberseite	1,8 %	0 %
{Unterseite	4,2 %	0 %
2. Primärblatt {Oberseite	17 %	0 %
{Unterseite	16 %	0 %
Stomata: Epidermiszellen:		
1. Primärblatt {Oberseite	1:1,8	1:2,7
{Unterseite	1:1,3	1:1,9

mata drängen sich im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 1) gegenseitig geradezu zusammen (Abb. 2), und es kam so zu einer Reihe abnormaler Bildungen, auf die später eingegangen wird. Wie Tab. 2 zeigt, stieg die Zahl der Stomata pro Quadratmillimeter auf das Drei- bis Sechsfache der normalen Werte. Die meist kleinen, wenig verzahnten Epi-

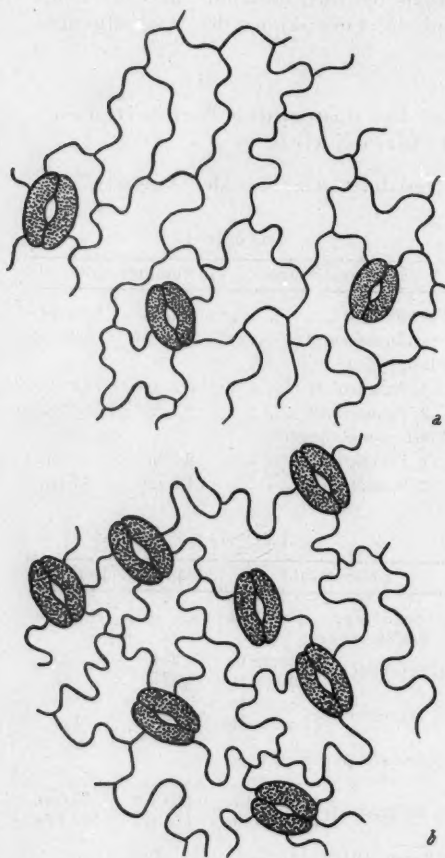


Abb. 1. *Vicia Faba*, Blattepidermis. a Oberseite, b Unterseite. Keimling in apfelgasfreier Luft.

dermiszellen traten an Zahl stark zurück. Wie die Verhältniswerte Spaltöffnungen: Epidermiszellen zeigen, wurde die Differenzierung der Epidermis zugunsten der Stomata gefördert. Betrachtet man die gesamte Blattfläche, so trug das gleich alte Blatt eines vergasteten Keimlings durchschnittlich die eineinhalbfache Anzahl an Spaltöffnungen, obwohl es nur ein Viertel der Größe des Kontrollblattes erreicht hatte.

Die Entwicklung der Stomata ging bei Blättern, die unter dem Einfluß des Apfelgases standen, langsamer vor sich als bei den unbehandelten Kontrollen. Bei einem zwanzig Tage alten Keimling ist, selbst wenn er in Apfel-luft gezogen wurde, die Entwicklung und Differenzierung des ersten Primärblattes abgeschlossen. Die wenigen unfertigen Entwicklungsstadien der Stomata, die sich in diesen Blättern noch fanden, dürfen als Dauerstadien gelten. Der Prozentsatz an unfertigen Spaltöffnungen steigt im zweiten Primärblatt rapid

an und muß, schon auf Grund der geringen Blattgröße, in diesem Falle als Zeichen einer durch die Gaswirkung bedingten Entwicklungsverzögerung angesehen werden. Das dritte Primärblatt, das bei einem normalen Keimling in diesem Alter fertig differenziert ist, ist am vergasteten Keimling überhaupt noch nicht zu sehen oder erst als sehr kleine, völlig undifferenzierte Anlage.

3. Verhalten der Keimlinge bei länger dauerndem Verweilen in Apfelloft (sechs Äpfel).

Alter der Keimlinge: 20 Tage
(gerechnet vom Tage der Aussaat).

Tabelle 3.

Größenverhältnis	In Apfelloft	Kontrolle
Sproßlänge	6 cm	16,9 cm
Sproßquerschnitt . .	0,6 cm	0,35 cm
Blattgröße:		
1. Primärblatt	1,1 cm ²	17,2 cm ²
Blattspreitenlänge:		
1. Primärblatt	1,3 cm	4 cm
2. Primärblatt	0,9 cm	3,5 cm

Dauer der Apfelgasbehandlung: 10 Tage (d. h. von dem Augenblick an, wo die Sproßspitze über dem Erdboden sichtbar wird).

Die Einwirkung von Apfelgas in „doppelter Stärke“ (sechs Äpfel) auf Keimlinge von *Vicia*

Faba ergab bezüglich des Längenwachstums eine Erhöhung, wenn auch

nicht Verdoppelung des Effekts. Die Sproßlängen der vergasteten Keimlinge standen zu denen der Kontrollen in einem Verhältnis von ca. 1 : 2,8. Das Wachstum der Blätter war besonders stark gehemmt, das erste Primärblatt erreichte nur ein Fünfzehntel der Fläche des Kontrollblattes, das zweite Primärblatt war bei einer Spreitenlänge von 9 mm noch vollständig undifferenziert.

Die Spaltöffnungszahlen und Verhältniswerte konnten in diesem Falle nur für das erste Primärblatt bestimmt werden.

Auch hier war in der Blattepidermis der Keimlinge, die in Apfelloft gewachsen waren, eine Vermehrung der Stomatanzahl pro Quadratmillimeter festzustellen, und zwar durchschnittlich um das Sechs- bis Siebenfache der Kontrollwerte. Überraschend sind die Verhältniszahlen Spaltöffnungen: Epidermiszellen, die ein wesentlich anderes Bild geben als bei den Pflanzen, die in Gegenwart von drei Äpfeln gehalten wurden. Es zeigte sich eine Verschiebung zugunsten der Epidermiszellen. Die ganze Blattfläche des Kontrollblattes trägt mehr als die doppelte Anzahl an

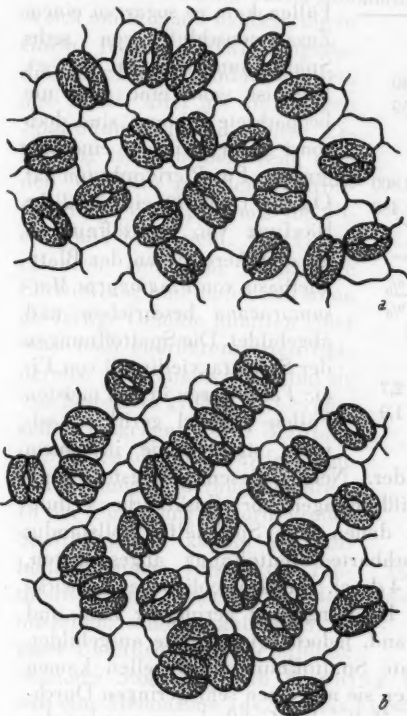


Abb. 2. *Vicia Faba*, Blattepidermis. a Oberseite, b Unterseite. Keimling unter dem Einfluß von Äthylen aus drei Äpfeln.

Die ganze Blattfläche des Kontrollblattes trägt mehr als die doppelte Anzahl an

Stomata als die des gleich alten Blattes eines vergasten Keimlings. Das Vielfache der Spaltöffnungszahl pro Quadratmillimeter erklärt sich daraus, daß das Flächenwachstum der Blattspreite bei jenen Keimlingen im verstärkten Maße gehemmt ist und daß es sich um sehr kleine Stomata — zum Teil noch um unvollendete Entwicklungsstadien — handelt.

Spaltöffnungsanomalien

In der Blattepidermis von Keimlingen, die in Apfelloft aufgewachsen sind, tritt eine Reihe abnormaler Stomatabildungen auf. Vorherrschend sind Spaltöffnungszwillinge,

Tabelle 4.

Stomatazahl	In Apfelloft	Kontrolle
Spaltöffnungen pro Quadratmillimeter:		
Blattoberseite	288	40
Blattunterseite	421	59
Spaltöffnungen pro Blattfläche:		
Blattoberseite	31.680	68.800
Blattunterseite	46.310	101.480
davon unfertige Entwicklungsstadien:		
Blattoberseite	23 %	0 %
Blattunterseite	21 %	0 %
Spaltöffnungen: Epidermiszellen:		
Blattoberseite	1:4,1	1:2,7
Blattunterseite	1:2,8	1:1,9

-drillinge, mitunter -vierlinge und -fünflinge, in selteneren Fällen kam es sogar zu einem Zusammenschluß von sechs Spaltöffnungen (Abb. 4 a—c). Dies ist wohl eine noch nie beobachtete Bildung, sind doch sonst schon Zwillinge eine Seltenheit. Für Pteridophyten hat Ogura (1938, 92) eine ähnliche Häufung von Spaltöffnungen an den Aerophoren der Blattstielbasis von *Plagiogyria Matsumuracana* beschrieben und abgebildet. Die Spaltöffnungen der Stomata „viellinge“ von *Vicia Faba* waren in den meisten Fällen parallel gerichtet, seltener standen sie in einem

spitzen bis rechten Winkel zueinander. Neben diesen häufigsten Anomalien kamen auch noch andere Mißbildungen vor: Zusätzliche Teilungen einer Schließzelle, Stomata, bei denen eine Spalthälfte vollständig unterdrückt oder, durch eine benachbarte Spaltöffnung abgeschnitten, nur als Rest vorhanden war (Abb. 4 d, c). Steckengebliebene Entwicklungsstadien fanden sich bei diesen Keimlingen in geringerer Zahl und hatten meist bereits die Trennungswand, jedoch keine Spalte ausgebildet. In ihrer Weiterentwicklung gehemmte Spaltöffnungsmutterzellen kamen sehr selten vor, wenn aber, so erreichten sie nur einen sehr geringen Durchmesser, wuchsen also nicht zu einer auffallenden Größe heran wie bei der Einwirkung anderer, schädigender Faktoren (Colchizin nach Weber 1943, Weißenböck 1950, UV-Bestrahlung nach Kropfitch 1951). Die steckengebliebenen Entwicklungsstadien enthielten in den Schließzellen nur selten normal geformte Chloroplasten, meist waren diese zu einem unförmigen Tropfen agglutiniert (vgl. Küster 1937). In den Schließzellen

normal ausgebildeter Stomata sowie in denen anderer Mißbildungen war keine Veränderung der Chloroplasten der Schließzellen weder ihrer Zahl noch ihrer Ausbildung nach zu bemerken.

Eine Erscheinung, die zwar mitunter auch an normalen Keimlingen zu finden ist, bei den vergasteten Keimlingen jedoch besonders häufig vorkommt, sei kurz erwähnt: Es finden sich in der Epidermis einzelne besonders große Stomata, deren Schließzellen vollgepfropft sind mit ebenfalls abnorm großen Chloroplasten.

Diese „Riesen“-Spaltöffnungen sind von einem breiten stomata-freien Hof“ umgeben (Abb. 4f). Reed und Hirano (1931) beschrieben solche Stomata für *Citrus* und suchten eine Erklärung für diese Erscheinung darin, daß es sich um Stomata handelt, die in einem frühen Entwicklungsstadium des Blattes gebildet wurden, also relativ älter als die übrigen Spaltöffnungen sind. Diese Erklärung ist plausibel, wenn man den Vergleich mit den Haarbildungen in der Epidermis von *Vicia Faba* heranzieht. Die Haare erfahren eine sehr frühzeitige Entwicklung und finden sich schon als fertige Gebilde inmitten einer sonst noch undifferenzierten Epidermis. Im fertigen Blatt sind sie von besonders großen Epidermiszellen umgeben. Diese Blattpartien haben offenbar sehr früh eine Entwicklungsförderung erfahren. In der Umgebung abnorm großer Spaltöffnungen kommt es nicht bloß zu einem verstärkten Flächenwachstum einzelner Epidermiszellen, sondern außerdem zu einer Unterdrückung der Bildung

weiterer Stomata. Nach Bünning (1948) bildet jede Spaltöffnung um sich eine Hemmzone aus, die das Entstehen weiterer Spaltöffnungen in der nächsten Umgebung verhindert. Möglicherweise ist diese Hemmwirkung in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Spaltöffnung besonders groß, und da die Riesenstomata vermutlich früher gebildet werden, so üben sie auch entsprechend früher und im stärkeren Maße einen hemmenden Einfluß auf ihre Umgebung aus.

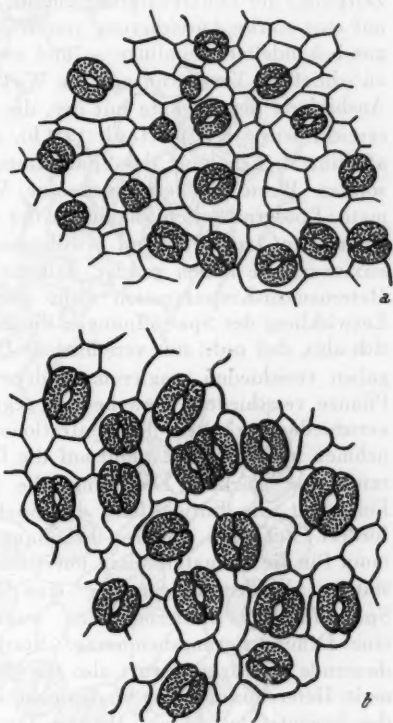


Abb. 3. *Vicia Faba*, Blattepidermis. a Oberseite, b Unterseite. Keimling unter dem Einfluß von Äthylen aus sechs Äpfeln.

Diskussion

In letzter Zeit hat eine Reihe von Forschern versucht, die durch Äthylen-gas hervorgerufenen Wachstumsänderungen als sekundäre Wirkung aufzufassen, die die Folge einer primären Beeinflussung des Wuchsstoffgehaltes bzw. der Wuchsstoffverteilung ist.

Wenn, nach Umrath (1948), die Zahl der Spaltöffnungen in der Blatt-epidermis einen Schluß auf den Wuchsstoffgehalt der Blattanlage zum Zeitpunkt der Differenzierung zuläßt, so wäre aus den Versuchsergebnissen auf eine starke Anreicherung von Wuchsstoffen in den Blättern mit Äpfelgas behandelter Keimlinge — und zwar bei einer mittleren Dosierung — zu schließen. Vergleicht man die Wirkung des Äthylens auf die Zahl und Ausbildung der Stomata mit der, die durch künstliche Heteroauxinzufuhr erreicht wird (Kropfisch 1951b), so findet sich eine auffallende Parallelität: 1. Erhöhung der Spaltöffnungszahl, und zwar nicht nur der absoluten Werte, sondern auch eine Verschiebung des Verhältnisses Stomata: Epidermiszellen zugunsten der ersteren. 2. Vorkommen zahlreicher Anomalien (vorherrschend Zwillings- und Drillingsbildungen). Heteroauxinversuche haben gezeigt, daß die für das Längenwachstum optimale Heteroauxin-Konzentration nicht übereinstimmt mit jener, die für die Entwicklung der Spaltöffnungen die günstigste Bedingung schafft. Es zeigt sich also, daß nicht nur verschiedene Pflanzen und Organe auf Wuchsstoffgaben verschieden reagieren, sondern daß innerhalb ein- und derselben Pflanze verschiedene Gewebe sich gegenüber künstlichen Wuchsstoffgaben verschieden verhalten. Konzentrationen, die das Längenwachstum fördern, nehmen noch keinen Einfluß auf die Differenzierung der Epidermis, während eine stärkere Dosierung, die bereits Wachstumshemmungen zur Folge hat, die Entwicklung der Spaltöffnungen in beträchtlichem Maße fördert. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration wird das Optimum für die Stomatabildung überschritten und es erfolgt neben einer sehr starken Wachstumshemmung eine Verschiebung der Verhältniswerte Spaltöffnungen: Epidermiszellen zugunsten der Epidermiszellen, also eine Differenzierungshemmung. Stark verdünnte Apfelfluft oder kurz-dauernde Einwirkung ruft also die gleichen Reaktionen hervor wie minimale Heteroauxindosen: Wachstumsförderung, jedoch keine Beeinflussung der Stomataentwicklung. Mittlere Dosis (drei Äpfel) schafft optimale Bedingungen für die Spaltöffnungsbildung, starke Dosis (sechs Äpfel) übt die gleichen hemmenden Wirkungen aus wie eine überdosierte Heteroauxinzufuhr. Es liegt demnach der Schluß nahe, daß das Äpfelgas gleichsinnig wirkt wie Heteroauxin. Im Falle der Spaltöffnungsbildung kann es sich entweder um die Aufhebung der von Bünning (1948) angenommenen Hemmwirkung der einzelnen Stomata, die eine Entstehung weiterer Spaltöffnungen in ihrer Umgebung verhindern, handeln, oder es ergibt sich eine derart gesteigerte Tendenz zur Stomataentwicklung, daß diese Hemmung einfach überwunden wird.

Crocker und Hitchcock (1933) haben das Äthylen auf Grund seiner wurzelbildenden Fähigkeit als ein Wachstumshormon bezeichnet. Die

V Versuchsergebnisse dieser Autoren lassen sich gut in die oben geäußerte Vorstellung einfügen: Bei den Heteroauxinversuchen zeigte sich bei Verwendung stärkerer Konzentrationen, die das Längenwachstum des Spross-

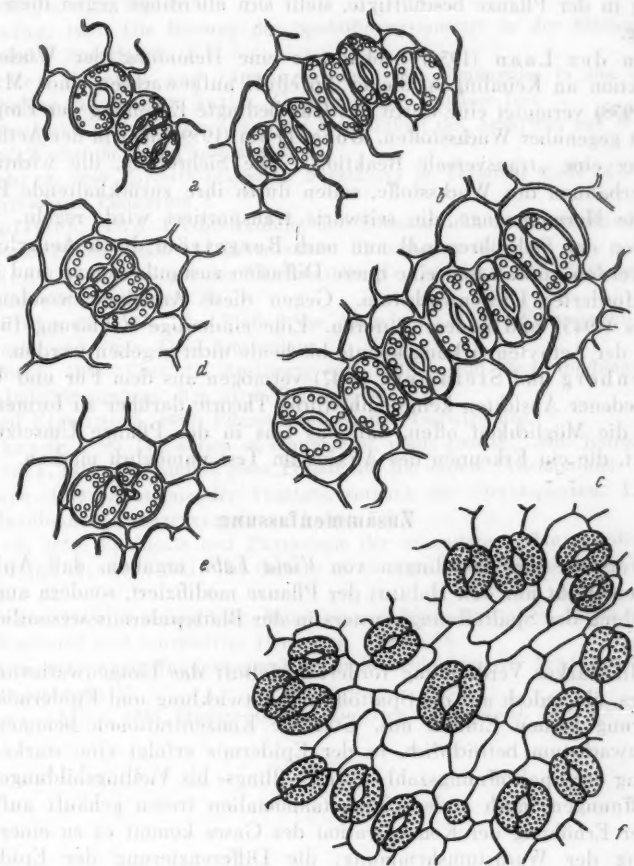


Abb. 4. *Vicia Faba*, Blattepidermis. Unterseite. Keimlinge mit Apfelfluft vergast. Spaltöffnungsanomalien, a Drillinge, b Fünflinge, c Sechslinge, d, e Zusätzliche Teilung einer Schließzelle, f Abnorm große Spaltöffnung, umgeben von einem stomatafreien Hof.

ses bereits nachteilig beeinflussen, eine auffallend geförderte Wurzelbildung. Laibach (1935) konnte bei Behandlung von Stengelinternodien intakter *Coleus*-Pflanzen mit konzentrierter β -Indolylessigsäure künstlich Wurzelbildung erreichen. Auch Molisch (1937) nimmt auf Grund

einer starken Kallusbildung bei *Populus pyramidalis*, hervorgerufen durch Apfelgas, an, daß diesem eine ähnliche Wirkung zukommt wie den Wuchsstoffen (siehe auch Hemberg 1949). Die Mehrzahl der Autoren, die sich bisher mit dem Einfluß des Äthylen auf Wuchsstoffproduktion und -verteilung in der Pflanze beschäftigte, stellt sich allerdings gegen diese Auffassung.

Van der Laan (1934) beobachtete eine Hemmung der Wuchsstoffproduktion an Keimlingen, die in Apfelfluft aufgewachsen sind. Michener (1938) vermutet eine durch das Gas bedingte Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Wuchsstoffen. Borgström (1939) sieht in der Äthylenwirkung eine „transversale Reaktion“. Die Siebröhren, die wichtigsten Wanderbahnen der Wuchsstoffe, sollen durch ihre zurückhaltende Fähigkeit die Hormonmenge, die seitwärts transportiert wird, regeln. Diese Funktion der Siebröhren soll nun nach Borgström durch Äthylen gestört werden, so daß nun eine quere Diffusion zustande kommt und daher ein gefördertes Dickenwachstum. Gegen diese Annahme wenden sich Borris (1943) und andere Autoren. Eine eindeutige Erklärung für das Wesen der Äthylenwirkung konnte bis heute nicht gegeben werden. Auch Guttenberg und Steinmetz (1947) vermögen aus dem Für und Wider verschiedener Ansichten keine einheitliche Theorie darüber zu formen und lassen die Möglichkeit offen, daß das Gas in der Pflanze Umsetzungen bewirkt, die ein Erkennen des Auxins im Test unmöglich machen.

Zusammenfassung

1. Versuche mit Keimlingen von *Vicia Faba* ergaben, daß Apfelgas (Äthylen) nicht nur den Habitus der Pflanze modifiziert, sondern auch die Ausbildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis wesentlich beeinflusst.

2. In starker Verdünnung fördert Apfelfluft das Längenwachstum des Sprosses, übt jedoch auf die Spaltöffnungsentwicklung und Epidermisdiffferenzierung keinen Einfluß aus. Stärkere Konzentrationen hemmen das Längenwachstum beträchtlich, in der Epidermis erfolgt eine starke Vermehrung der Spaltöffnungszahl sowie Zwillings- bis Viellingsbildungen der Spaltöffnungen; auch andere Stomataanomalien treten gehäuft auf. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration des Gases kommt es zu einer Verstärkung der Wachstumshemmung; die Differenzierung der Epidermis wird nachteilig beeinflusst; die Verhältniszahl Epidermiszellen: Spaltöffnungen wird zugunsten der ersteren verschoben.

3. Diese Reaktionen der Pflanzen auf Apfelgas sind ähnlich denjenigen, die durch künstliche Heteroauxinzufuhr erzielt werden. Das Optimum der wachstumsfördernden Wirkung des Heteroauxins liegt bei einer Konzentration, die die Differenzierung der Blattepidermis nicht beeinflusst, während Dosen, die eine maximale Vermehrung der Stomata in der Epidermis auslösen, Hemmung des Längenwachstums zur Folge haben. Eine weitere Steigerung der Heteroauxingaben hemmt sowohl das Längenwachstum der Sprosse als auch die Differenzierung der Epidermis.

Literatur

- Avery and Johnson, 1947: Hormones and Agriculture. New York.
- Borgström, 1939: The Transverse Reactions of Plants. Lund.
- Borriess, 1943: Über das Wesen der wachstumshemmenden Wirkung des Äthylens. Jb. wiss. Bot. 91.
- Bünning, 1948: Die Bildung des Spaltöffnungsmusters in der Blattepidermis. Zeitschr. Naturforsch. 3.
- Crocker, Hitchok und Zimmermann, 1935: Similarities in the effect of ethylene and the plant auxins. Contrib. Boyce Thomson Inst. 7.
- Guttenberg und Steinmetz, 1947: Der Einfluß des Äthylens auf Wuchsstoff und Wachstum. Die Pharmazie 2.
- Hemberg, 1949: Growth-Inhibiting Substances in Terminal Buds of *Fraxinus*. Physiologia Plantarum 2.
- Kropfitch, 1951a: UV-Bestrahlung und Stomata-Bildung. Protoplasma 40.
- 1951b: Stomata-Zahl und Heteroauxin. Protoplasma 40.
- Küster, 1937: Pathologie der Pflanzenzelle II. Pathologie der Plastiden. Protoplasma-Monographien 13.
- Laan van der, 1934: Der Einfluß des Äthylens auf die Wuchsstoffbildung bei *Avena* und *Vicia*. Diss. Amsterdam.
- Laibach, 1955: Über die Auslösung von Kallus- und Wurzelbildungen durch β -Indolyllessigsäure. Ber. dtsh. Bot. Ges. 50.
- und Fischnich, 1950: Pflanzenwuchsstoffe. Ludwigsburg.
- Michener, 1938: The action of ethylene on plant growth. Am. Journ. Bot. 25.
- Molisch, 1937: Der Einfluß einer Pflanze auf die andere (Allelopathie). Jena.
- Ogura, 1938: Anatomie der Vegetationsorgane der Pteridophyten. Linsbauer: Handbuch d. Pflanzenanatomie. II. Abt. 7/2 B.
- Paech, 1950: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin.
- Reed and Hirano, 1951: The density of stomata in *Citrus* leaves. Journ. Agricult. 42.
- Umrath, 1948: Dornenbildung, Blattform und Blütenbildung in Abhängigkeit von Wuchsstoff und korrelativer Hemmung. Planta 36.
- Weber, 1943: Spaltöffnungsapparat-Anomalien colchiziniertes *Tradescantia*-Blätter Protoplasma 37.
- Weissenböck, 1950: Studien an colchizinierten Pflanzen. II. Teil. Phytion 2.

UV-Bestrahlung und Stomatazahl

Von

Maria Kropfisch

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

Mit 6 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. Januar 1951)

Es wurde wiederholt versucht, die Ausbildung der Stomata auf experimentellem Wege zu beeinflussen. Die ältere Literatur hat Küster (1925) zusammengefaßt. Von neueren Arbeiten seien erwähnt die von Weber (1943), Tonzig e Ott-Candella (1946), Weissenböck (1948, 1950), Reese (1950), die sich mit dem Einfluß von Coldicin auf die Stomatabildung beschäftigen, die von Umrath (1948) und von Kropfisch (1951), die sich mit der Wirkung von Heteroauxin befassen, und die von Kropfisch (1951 a) über den Effekt von „Apfelgas“ (Äthylen). Die vorliegende Untersuchung behandelt die Stomatabildung unter der Wirkung von UV-Bestrahlung. Obwohl über die Veränderungen, die ultraviolette Strahlen an pflanzlichen Organen und Zellen verursachen, zahlreiche Arbeiten vorliegen (Schanz 1918, 1919, 1920, 1922, Jacobi 1928, Freytag 1933, Popp and Brown 1936, Hare and Kersten 1937, Kögl 1937, Popp and McIlvaine 1937, Biebl 1941, Wuhrmann-Meyer 1941, Biebl 1942, Toth 1949 u. a.), so ist doch nichts Näheres darüber bekannt, wie die Differenzierung der Blattepidermis, als der von der Bestrahlung am stärksten betroffenen Zellschicht, von den UV-Strahlen modifiziert wird.

Als Versuchspflanze erwies sich *Vicia Faba* sehr geeignet. 20 bis 30 Tage alte Keimlinge wurden in einer Entfernung von 40 cm den ungefilterten Strahlen einer UV-Lampe (Original Hanau-Jubiläumshöhensonne) ausgesetzt, die Einzeldauer und die Häufigkeit der Bestrahlungen wurde variiert.

1. Spaltöffnungsanomalien an UV-bestrahlten Blättern

Zunächst sei hervorgehoben: Ein Effekt der UV-Strahlen auf die Stomatabildung war nur dann zu sehen, wenn die Blättchen im jungen, noch undifferenzierten Zustand bestrahlt wurden. Eine Nachwirkung der Bestrahlung wurde selbst bei starker Dosierung niemals beobachtet. Blätter, die sich erst nach Abschluß der Bestrahlung zu differenzieren begannen, entwickeln ausschließlich normale Stomata.

An den Blättern der *Vicia-Faba*-Keimlinge, die im geeigneten Entwicklungsstadium UV-bestrahlt worden waren, traten zahlreiche abnormale Stomata auf, und zwar sowohl an Licht- als auch an etiolierten Dunkel-

keimlingen. Neben Zwillingsbildungen, asymmetrischen, verzweigten Spaltöffnungen (Abb. 1) finden sich als häufigste Erscheinung persistierende Spaltöffnungsmutterzellen. Solche an ihrer definitiven Ausbildung verhinderte Spaltöffnungsanlagen hat zuerst Weber (1943) für colchicinierte Blätter von *Tradescantia* beschrieben. Es handelt sich bei diesen Bildungen der UV-bestrahlten *Vicia-Faba*-Blätter ebenso wie bei den colchicinierten Blättern von *Tradescantia* nicht etwa um embryonale Stadien, sondern um definitiv ausgebildete Dauerzellen, bei denen der letzte zur Bildung der Schließzellen führende Teilungsschritt unterblieben ist. Tonzige Ott-Candela (1946) haben an den Cotyledonen verschiedener Pflanzen bei Colchicin-Einwirkung persistierende Initialen sich entwickeln sehen, Weissenböck (1948, 1950) an den Keimblättern von *Lupinus albus*. Besonders

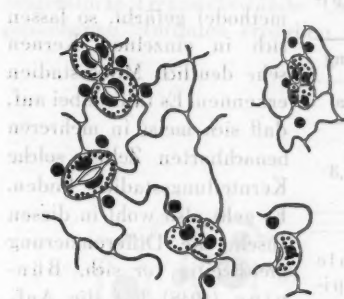


Abb. 1. Spaltöffnungsanomalien an UV-bestrahlten *Vicia-Faba*-Blättern.

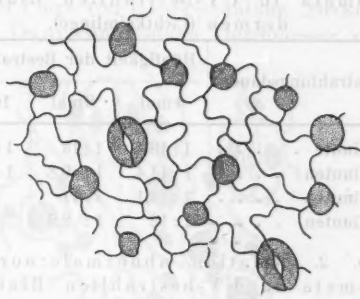


Abb. 2. Epidermis der Unterseite UV-bestrahlter *Vicia-Faba*-Blätter: Zahlreiche persistierende Spaltöffnungsmutterzellen („Dauermutterzellen“).

auffallend ist die Identität der Anomalien, die vor kurzem Reese (1950) an colchicinierten Keimlingen von *Petroselinum* und *Lepidium* erhalten hat.

In der Flächenansicht zeigen die persistierenden Spaltöffnungsmutterzellen von *Vicia Faba* meist kreisrunden bis ellipsoiden, selten eckig polygonalen Umriß, gelegentlich findet man aber auch andere Umrißformen. Die abnormen Stomata treten an den bestrahlten Blättern mit seltenen Ausnahmen nur an der Unterseite auf. Dies dürfte seinen Grund darin haben, daß die jungen Blättchen in der Knospenlage vor der Entfaltung nur mit der Unterseite direkt der Bestrahlung ausgesetzt sind. Bei normal sich entwickelnden *Vicia-Faba*-Blättern ist die Differenzierung der Epidermis sehr früh abgeschlossen. Schon bei einer Länge der Blattspreite von nur 12 mm finden sich an der Unterseite fertig ausgebildete, funktionsfähige Stomata, daneben allerdings auch noch unfertige Entwicklungsstadien. Bei einer Spreitenlänge von 25 bis 28 mm, der Größe, bei der sich das Blatt zu entfalten beginnt, ist die Differenzierung der Epidermis durchwegs beendet, auch an der Blattoberseite ist dann die Trennungswand zwischen den Schließzellen bereits vorhanden, die Spalte allerdings vielfach noch nicht.

Erst in diesem Stadium wird bei der Bestrahlung die Oberseite direkt getroffen. Da die UV-Strahlen in der angewendeten Dosis nur auf der direkt von ihnen betroffenen Fläche eine erkennbare Wirkung ausüben, wird es verständlich, daß die Blättchen, die nach der Entfaltung bestrahlt werden, an der Oberseite keine Stomata-Anomalien aufweisen. Die abnormalen Spaltöffnungen sind nicht gleichmäßig über die Blattfläche verteilt, sie treten vielmehr meist gruppenweise auf. Es finden sich neben Blattfeldern, die ausschließlich normale Stomata aufweisen, solche, auf denen die abnormen Stomata überwiegen (Abb. 2). Um eine Erklärung für dieses inselartige Auftreten der Anomalien zu finden, muß man die Entwicklung eines jungen Blattes beachten. Wird die sich eben differenzierende Epidermis eines solchen

Tab. 1. Relation abnormale:normale Stomata in UV-bestrahlten Blattepidermen (Lichtkeimlinge).

Bestrahlungsdauer	Häufigkeit der Bestrahlung		
	4mal	8mal	16mal
1 Minute	1:18	1:13	1:11
2 Minuten	1:14,4	1: 9,8	1: 8,3
3 Minuten	1:13,1	1:11	1
5 Minuten	1:12	1: 2,9	

Tab. 2. Relation abnormale:normale Stomata in UV-bestrahlten Blattepidermen (Dunkelkeimlinge).

Bestrahlungsdauer	Häufigkeit der Bestrahlung
	8mal
1 Minute	1:4
2 Minuten	1:3

Blattes mit Karmin-Eisessig (Heitzsche Kochmethode) gefärbt, so lassen sich in einzelnen Kernen sehr deutlich Mitosestadien erkennen. Es fällt dabei auf, daß sich meist in mehreren benachbarten Zellen solche Kernteilungsstadien finden. Es geht also wohl in diesen Inseln die Differenzierung gleichzeitig vor sich. Büning (1948) hat die Aufmerksamkeit auf ein bei der Differenzierung weit verbreitetes Ordnungsprinzip gelenkt; er beobachtete, daß z. B. die Anlage für Sekretbehälter im Blatt mit der Differenzierung von „Nestern“ sich teilender Zellen beginnt. Die UV-Strahlen können nach Schulze (1910) auf die Zellwandbildung nur dann einen hemmenden Einfluß ausüben, wenn die Zelle in einem bestimmten Teilungsstadium der Strahlenwirkung ausgesetzt wird. Geht nun in solchen „Teilungsnestern“ die Zellteilung ungefähr gleichzeitig vor sich, so werden sie von den Strahlen im selben Entwicklungsstadium getroffen. Es erklärt sich daraus die lokale Anhäufung abnormaler Stomatabildungen im fertig ausgebildeten Blatt.

Die abnorm entwickelten Spaltöffnungen sind in den bestrahlten Blattepidermen gegenüber den normal ausgebildeten in der Minderheit. Die Anomalien treten, wenn auch sehr vereinzelt, schon nach einer einmaligen, eine Minute dauernden Bestrahlung auf, ihr Prozentsatz steigert sich mit zunehmender Dauer und Häufigkeit der Bestrahlung (Tab. 1).

Die im Dunklen gezogenen Keimlinge zeigen einen bedeutend höheren Prozentsatz an abnormalen Spaltöffnungen im Vergleich zu den Lichtkeimlingen (Tab. 2). Dies kann möglicherweise durch eine größere Strahlen-

Empfindlichkeit der im Dunklen gezogenen Keimlinge bedingt sein. Es ist bekannt, daß die Differenzierung der Stomata bei Dunkelkeimlingen vor der Differenzierung der Epidermis beginnt. Es ist also möglich, daß die Stomata in der Dunkelphase schon in einem früheren Stadium der Differenzierung getroffen werden, was zu einer höheren Anzahl von Anomalien führt.

empfindlichkeit der etiolierten Pflanzen verursacht sein, eine Vermutung, die nach den makroskopisch beobachteten Veränderungen jedoch nicht wahrscheinlich ist. Eher erklärt sich wohl die höhere Zahl der abnormen Stomatabildungen aus der außerordentlich langsamen Differenzierung etiolierter Blätter. Die Wahrscheinlichkeit, daß von den UV-Strahlen Teilungsstadien getroffen werden, ist hier größer als bei den Lichtkeimlingen, deren Epidermis sich viel rascher differenziert.

II. Die persistierenden Spaltöffnungsmutterzellen

1. Kerngröße

Normale Spezialmutterzellen von *Vicia Faba* weisen maximal einen Durchmesser von 15μ auf, ältere Entwicklungsstadien besitzen stets bereits ausgebildete Trennungswände. Die in Folge von UV-Bestrahlung „stecken-gebliebenen“ Initialen erreichen im Durchschnitt einen Durchmesser von

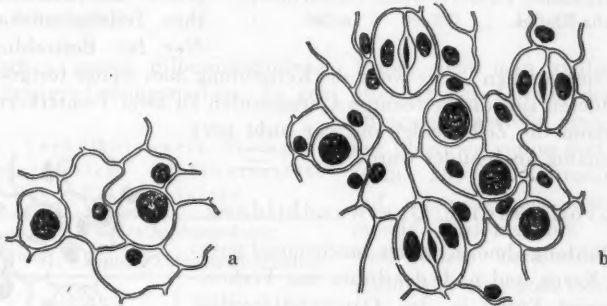


Abb. 3. Dauermutterzellen UV-bestrahlter *Vicia-Faba*-Blätter mit großen Zellkernen. a Lichtkeimling, b Etiolierter Keimling.

27μ , im Maximum von 34μ . Es ergibt sich daraus, daß die Bestrahlung in der angewandten Dosierung zwar die Zellteilung (Querwandbildung) verhindert, nicht aber die Zellvergrößerung.

An mit Carnoy fixierten und mit Karmin-Eisessig gefärbten Epidermispräparaten wurde Form und Größe der Zellkerne der persistierenden Spaltöffnungsmutterzellen (= Dauermutterzellen) studiert. Im Flächenbild erscheinen die Kerne meist kreisrund, selten halbmondförmig (Abb. 3). Die Kerne liegen in der Mitte der Zelle in einer Plasmatasche, von der starke Aufhängefäden zum wandständigen Cytoplasma führen.

Der Kerndurchmesser der Dauermutterzellen steht zu dem der Epidermiszellen in einer Relation von genau 2 : 1. Junge normale Mutterzellen besitzen allerdings auch Kerne, die größer sind als die der Epidermiszellen, bei diesen ist die Relation aber 2,5 : 1. (Über die Kern-Zellrelationen der Epidermiszellen und Schließzellen siehe Klieneberger 1918.)

Die auffallende Größe des Zellkernes der Dauermutterzellen sowie das wenn auch vereinzelte Vorkommen von zwei Kernen in einer solchen Mutterzelle (Abb. 4) sprechen dafür, daß es infolge der UV-Bestrahlung durch

einen endomitoseähnlichen Prozeß zur Bildung tetraploider Kerne gekommen ist. Diese Annahme, die auch Weber (1943), Tonzig e Ott-Candella (1946) und Reese (1950) für die großkernigen Dauermutterzellen aussprach, die durch Colchicinierung entstehen, wird durch ältere Beobachtungen von Schulze

(1910) gestützt. Schulze untersuchte erstmalig die Wirkung ultravioletter Strahlen auf die Teilung pflanzlicher Zellen, und zwar an Staubfadenhaaren von *Tradescantia virginica*. Bei allen Versuchen setzten während der Bestrahlungen „Netz- und Knäuelstadien“ ihre Teilung niemals fort. Nur bei Bestrahlung von

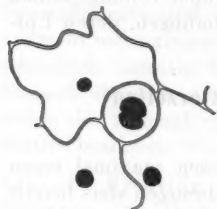


Abb. 4. Zweikernige Dauermutterzelle eines UV-bestrahlten *Vicia-Faba*-Blattes.



Abb. 5. Unvollständige Querwandbildung einer Dauermutterzelle.

„Muttersternstadien“, oder wenn die Kernteilung noch weiter fortgeschritten war, bildeten sich die getrennten Chromatiden zu zwei Tochterkernen um, wobei dann die Zellscheidewand gar nicht oder unregelmäßig ausgebildet wurde.

2. Unvollständige Querwandbildung

Die Bildung abnorm großer, anscheinend tetraploider Kerne und noch deutlicher das Vorkommen zweier Kerne in den Dauermutterzellen, schließlich die obigen Beobachtungen von Schulze berechtigten zur Annahme, daß durch die Bestrahlung die Querwandbildung der Spaltöffnungsinitialen unterbunden wird. Es überrascht daher nicht, daß bei den bestrahlten *Vicia-Faba*-Blättern gar nicht selten in den Dauermutterzellen unvollständige Querwände zu finden sind (Abb. 5). Auch hierin besteht ein analoges Verhalten wie bei colchicinierten Zellen, denn Mairold (1943) hat — allerdings an einer ganz anderen Pflanze (*Spirogyra*) — bei Colchicinierung unvollständige Querwandbildung beschrieben. (Weitere Angaben bei Pekarek 1938).

3. Chloroplastenzahl

Die unter Einwirkung der UV-Bestrahlung zu Dauerzellen gewordenen Spaltöffnungsmutterzellen enthalten normal entwickelte Chloroplasten. Die Zahl der Chloroplasten beträgt auffallenderweise meist genau das Doppelte der Chloro-

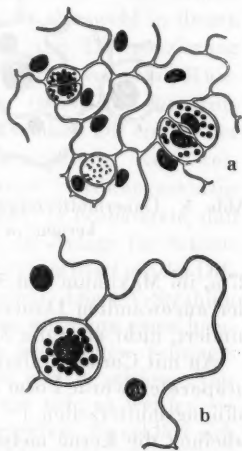


Abb. 6. Chloroplasten in Spaltöffnungsmutterzellen. a Junge normale Spaltöffnungsmutterzelle, b Alte persistierende Spaltöffnungsmutterzelle eines UV-bestrahlten Blattes.

plastenzahl einer normalen Schließzelle oder die Summe der Chloroplasten der beiden Schließzellen, nämlich 20 bis 30 Plastiden (Abb. 6). In embryonalen Spaltöffnungsmutterzellen sind die Plastiden schwer nachzuweisen, am besten gelingt es durch Schwärzung mit Hilfe der

Tab. 3. Stomatazahl am 2. Primärblatt.

Bestrahlungs- dauer	Stomata pro mm ²		Stomata pro Blattfläche	
	Oberseite	Unterseite	Oberseite	Unterseite
4 mal 1 Min.	44	60	80.250	109.440
8 mal 1 Min.	41	57	67.320	93.590
12 mal 1 Min.	40	58	60.920	88.330
4 mal 2 Min.	45	59	81.450	106.790
8 mal 2 Min.	44	62	78.300	92.560
12 mal 2 Min.	42	60	64.760	92.520
4 mal 5 Min.	40	56	56.320	78.840
0 (Kontrollen)	42	58	84.290	116.400

Giroudschen sauren Silbernitratlösung. Dabei sieht man vielfach auch hantelförmige Teilungsstadien. Es geht

Tab. 4. Verhältniszahlen Stomata: Epidermiszellen. Blattunterseite des 2. Primärblattes.

Häufigkeit der Bestrahlung	Bestrahlungsdauer		
	1 Minute	2 Minuten	5 Minuten
4 mal . . .	1:2	1:2,2	1:3,1
8 mal . . .	1:2,1	1:2,3	
12 mal . . .	1:2,4	1:2,9	

Kontrollwert 1:1,8

man in solchen Fällen aus der Anzahl der Chloroplasten Rückschlüsse auf den Polyploidiegrad der Zelle ziehen könne.

Dabei sieht man vielfach auch offenbar der Teilung der Spaltöffnungsmutterzelle eine Teilung der Plastiden voraus (vgl. Bauer 1942). Die UV-Bestrahlung übt auf diese Teilung keine hemmende Wirkung aus. Ähnliche Verhältnisse beschreibt Reese (1950), der eine noch stärkere Erhöhung der Chloroplastenzahl für Dauermutterzellen, die durch Colchicinierung entstanden sind, beobachtet. Reese meint, daß

III. Stomatazahl UV-bestrahlter Blätter

a) Lichtkeimlinge

Blätter, die während ihrer Entwicklungsperiode UV-bestrahlt wurden, erfuhren in der Differenzierung ihrer Epidermis im Vergleich zu den Kontrollen wesentliche Veränderungen.

An UV-bestrahlten Lichtkeimlingen nahm die Zahl der Stomata ab. Die Durchschnittswerte der Spaltöffnungszahlen pro Quadratmillimeter zeigten zwar keine wesentlichen Unterschiede (Tab. 3). Berücksichtigt man jedoch die gesamte Blattbreite, die bei UV-Bestrahlung eine sich bei zunehmender Strahlendosis steigende Wachstumshemmung erfuhr, so zeigten sich deutliche Unterschiede. Die Epidermiszellen sind entsprechend kleiner und ein Vergleich der Relation Stomata : Epidermiszellen läßt erkennen, daß

kurzwellige Strahlen die Spaltöffnungsbildung im Sinne einer Hemmung beeinflusst (Tab. 4).

b) Etiolierte Keimlinge

Im Dunklen gezogene Keimlinge verhielten sich bei UV-Bestrahlung, was die Stomata-Ausbildung betrifft, anders als die Lichtkeimlinge.

Die Durchschnittswerte der Stomata pro Quadratmillimeter geben auch in diesem Falle ein falsches Bild, da bei den Dunkelkeimlingen die Bestrahlung mit der Quarzlampe das Flächenwachstum der Blattspreite fördert und die Stomata daher weiter auseinandergerückt erscheinen. Die Gesamtzahl

Tab. 5. Stomatazahl am 2. Primärblatt.

Bestrahlungsdauer	Stomata pro mm ²		Stomata pro Blattfläche	
	Oberseite	Unterseite	Unterseite	Oberseite
4 mal 2 Min.	128	152	88.160	74.240
8 mal 2 Min.	122	158	101.120	78.080
4 mal 4 Min.	140	169	81.120	67.200
Kontrollen	169	209	83.600	67.600

der Spaltöffnungen pro Blattfläche stieg an den Blättern der Dunkelkeimlinge bei mäßiger Bestrahlung an. Keimlinge, die oftmals kürzere Zeit der Strahlenwirkung ausgesetzt waren, verhielten sich anders als solche, die

weniger oft, aber dafür länger bestrahlt wurden, wenn auch die Gesamtdauer der Bestrahlung übereinstimmt. Intensivere Bestrahlung bedingte dagegen eine geringfügige Hemmung der Stomatabildung. Die Verhältniswerte Spaltöffnungen: Epidermiszellen geben ein analoges Bild (Tab. 6): Kurz andauernde, wiederholte Bestrahlung förderte die Differenzierung der Epidermis, d. h. erhöht die Stomatazahl.

Tab. 6. Verhältniswerte Stomata: Epidermiszellen. Blattunterseite des 2. Primärblattes.

Häufigkeit der Bestrahlung	Bestrahlungsdauer	
	2 Minuten	4 Minuten
4 mal	1:2,4	1:2,6
8 mal	1:1,9	
Kontrollwert 1:2,6		

Nach der Ansicht von Umrath (1948) wird die Zahl der Stomata durch Wuchsstoffe beeinflusst. Kögl (1937) hat gezeigt, daß das Licht auf die pflanzlichen Auxine inaktivierend wirkt. Eine Reihe von Autoren hat sich im besonderen mit dem Einfluß der ultravioletten Strahlen auf die Wuchsstoffe beschäftigt. Hare and Kersten (1937) stellten chemische Veränderungen der Indol-3-N-Propionsäure fest; sie vermuten, daß möglicherweise der wachstumshemmende Effekt der kurzwelligen Strahlen durch die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf das Tryptophan zu erklären sei. Popp and McIlvaine (1937) konnten in ihren Versuchen tatsächlich eine Reduktion der pflanzlichen Wuchsstoffe feststellen, die mit steigender Bestrahlungsdauer zunahm. Bringt man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit der Annahme Umraths, so läßt sich die Abnahme der Spaltöffnungszahl

an UV-bestrahlten Blättern von im natürlichen Licht aufgewachsenen Keimlingen verstehen. Das andersartige Verhalten der Dunkelkeimlinge hat seine Ursache wohl darin, daß die Wuchsstoffbildung weitgehend vom Licht abhängig ist. Wenn beim Lichtkeimling auch nicht der gesamte neugebildete Wuchsstoff wirksam wird, da er zum Teil durch das Licht eine Inaktivierung erfährt, so ist der etiolierte Keimling doch ausschließlich von dem im Samen enthaltenen Reservewuchsstoff abhängig (Overbeek 1953). Kolda (1937) gibt an, daß die Zahl der Spaltöffnungen an etiolierten Blättern äußerst gering ist, die Oberseite der Blättchen von *Vicia Faba* sei überhaupt stomatafrei. In eigenen Versuchen konnten diese Angaben im wesentlichen bestätigt werden, allerdings mit der Einschränkung, daß sowohl die Ober- als auch die Unterseite der etiolierten Blätter immerhin Spaltöffnungen trugen, die Zahl derselben sich jedoch von Blatt zu Blatt immer mehr verringerte. Durch periodische Belichtung konnte die Spaltöffnungsentwicklung beeinflusst werden, offenbar ermöglicht schon ein kurzes Verweilen im Licht die Bildung von Wuchsstoffen, die ihrerseits die Differenzierung der Epidermis fördert. Häufigere, kurz dauernde UV-Bestrahlung hat den gleichen Effekt: Die Zahl der Stomata wird erhöht.

Zusammenfassung

1. An den Blättern UV-bestrahlter *Vicia-Faba*-Lichtkeimlinge nimmt die Zahl der Spaltöffnungen mit steigender Bestrahlungsdosis ab: Die Relation Stomata : Epidermiszellen wird zugunsten der letzteren verschoben.
2. Dunkelkeimlinge erfahren bei mäßiger UV-Bestrahlung in der Blatt-epidermis eine Förderung der Stomataentwicklung.
3. Die Abnahme der Stomatazahl bei den Lichtkeimlingen dürfte auf eine Wuchsstoff-Inaktivierung infolge der UV-Bestrahlung zurückzuführen sein. Etiolierte Keimlinge, die normalerweise nicht imstande sind, Wuchsstoff zu bilden, dürften bei schwacher Bestrahlung zur Auxinbildung befähigt sein, was zu der Steigerung der Spaltöffnungsentwicklung führt.
4. An der Unterseite UV-bestrahlter Blätter finden sich zahlreiche Spaltöffnungsanomalien, vor allem persistierende Spaltöffnungsmutterzellen. Erhöhte Kerngrößen, das Auftreten von zwei Kernen in einer Dauermutterzelle sowie das Vorkommen unvollständiger Querwandbildungen machen es wahrscheinlich, daß es in den Dauermutterzellen durch einen endomitose-ähnlichen Vorgang zur Bildung tetraploider Kerne gekommen ist.

Literatur

- Bauer, 1942: Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. Flora 36.
- Biebl, 1941: Wirkung der UV-Strahlung auf *Allium*-Zellen. Protoplasma 36.
- 1942: Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. Protoplasma 37.
- Bünning, 1948: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin.
- Freytag, 1933: Zur Kenntnis der UV-Strahlenwirkung auf Blätter und Fruchtschalen. Bh. Bot. Ztbl. 51, Abt. I.
- Geitler, 1949: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Wien.
- Hare and Kersten, 1937: Effect of Ultraviolet-Radiation on Indole-3-N-propionic acid. Plant Physiology 12.
- Protoplasma, Bd. XL/2.

- Jacobi, 1928: Untersuchungen über die Wirkung des UV-Lichtes auf Keimung und Wachstum. Beitr. Biol. Pfl. 16.
- Klieneberger, 1918: Über die Größe und Beschaffenheit der Zellkerne. Bh. Bot. Ztbl. 35, Abt. I.
- Kluywer, 1911: Beobachtungen über die Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf höhere Pflanzen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien 120.
- Kögl, 1937: Wirkstoffprinzip und Pflanzenwachstum. Naturwiss. 25.
- Kolda, 1937: Anatomie etiolierter und periodisch belichteter Pflanzen. Bh. Bot. Ztbl. 57, Abt. A.
- Kropfitch, 1951: Stomata-Zahl und Heteroauxin. Protoplasma. 40.
- 1951a: Apfelfasgewirkung auf Stomata-Zahl. Protoplasma 40.
- Küster, 1925: Pathologische Pflanzenanatomie. Jena.
- Mairold, 1943: Studien an colchicinierten Pflanzen. Protoplasma 37.
- Overbeek, 1935: Wuchsstoff, Lichtwachstumsreaktion und Phototropismus bei *Raphanus*. Rec. trav. bot. Neerl. 30.
- Pekarek, 1958: Über unvollständige Membranbildungen. Protoplasma 50.
- Popp and Brown, 1935: A review of recent work on the effect of ultraviolet radiation upon seed plants. Bull. Torrey Bot. Club 60.
- and McIlvaine, 1937: Growth substances in relation to the mechanism of the action of radiation on plants. Journ. Agricult. 55.
- Reese, 1950: Beiträge zur Wirkung des Colchicins bei der Samenbehandlung. Planta 38.
- Richter, 1952: Neue Beiträge zur Photosynthese und Photolyse vornehmlich an der lebenden Pflanze. Denkschr. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturw. Kl. 103.
- Schanz, 1918: Einfluß des Lichtes auf die Gestaltung der Vegetation. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 36.
- 1919: Wirkungen des Lichtes verschiedener Wellenlänge auf die Pflanze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 37.
- 1920: Gehalt des Lichtes an UV. Arch. Ophthalmologie 103.
- 1922: Gehalt des Lichtes an UV. Arch. Ophthalmologie 107.
- Schulze, 1910: Über die Einwirkung der Lichtstrahlen von 280 μ Wellenlänge auf Pflanzenzellen. Bh. Bot. Ztbl. 25, Abt. I.
- Tonzig e Ott-Candella, 1946: L'azione della colchicina sullo sviluppo degli apparati stomatici. Nuovo Giorn. Bot. Ital. N. S. 53.
- Toth, 1949: Quantitative Untersuchungen über die Wirkungen der UV-Bestrahlung auf die Plasmapermeabilität. Österr. Bot. Ztschr. 46.
- Umrath, 1948: Dornenbildung, Blattform und Blütenbildung in Abhängigkeit von Wuchsstoff und korrelativer Hemmung. Planta 36.
- Ursprung und Blum, 1917: Über die Schädlichkeit ultravioletter Strahlen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 35.
- Weber, 1943: Spaltöffnungsapparat-Anomalien colchizinierten *Tradescantia*-Blätter. Protoplasma 37.
- Weissenböck, 1948: Studien an colchicinierten Pflanzen I. Anatomische Untersuchungen. Phytion 1.
- 1950: Studien an colchizinierten Pflanzen II. Phytion 2.
- Wuhrmann-Meyer, 1941: Untersuchungen über die Absorption ultravioletter Strahlen durch Kutikular- und Wachsschichten von Blättern. Planta 32.

Institut für Histologie und Embryologie der Universität Graz, (Vorstand:
Prof. Dr. C. Zawisch)

Versuch einer physiko-chemischen Analyse der Silber- imprägnationsmethode nach Bielschowsky-Gros

Von

Walther Lipp

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 9. Februar 1951)

Die Zahl der Modifikationen der ursprünglichen Bielschowsky-Silberimprägnationsmethode zur Darstellung der Nervenfasern ist fast nicht mehr zu übersehen und wächst von Jahr zu Jahr. Es scheint hier die Unzahl der vorgeschlagenen Rezepte das Fehlen einer wirklich theoretisch begründeten Methodik anzuzeigen. Die Mehrzahl der proponierten Verbesserungen dürfte empirisch gefunden worden sein. Andererseits steht aber das Studium des Nervensystems zur Zeit im Mittelpunkt des Interesses. In den letzten Jahren ist besonders über die Struktur des vegetativen Nervensystems und über seine Endigungsweise in der Peripherie eine Reihe von Ansichten entwickelt worden, die sich zum Teil widersprechen. Es sei nur an Boekes Konzeption des sympathischen Grundplexus, an die Vorstellungen Stöhrs über das Terminalretikulum, an den metaterminalen Apparat Webers und schließlich an die „fibres protoplasmiques“ von Jabonero erinnert. Diesen an Silberimprägnationspräparaten erhobenen Befunden steht noch der nervöse Grundplexus Hillarps gegenüber, welcher mit Methylenblau darstellbar ist. Den unterschiedlichen Vorstellungen über die Struktur des peripheren vegetativen Systems liegt immerhin nur ein morphologisches Substrat zugrunde. Die wechselnden Bilder der mikroskopischen Präparate müssen also zu einem großen Teil auf der Verschiedenheit der von den einzelnen Autoren bevorzugten Imprägnationsmethoden beruhen. Zum Überfluß wird noch die nervöse Natur von manchen der dem vegetativen System zugeschriebenen Bildungen ebenso leidenschaftlich behauptet wie bestritten.

Es ist allgemein bekannt und anerkannt, daß die Silberimprägnation kein spezifisches Darstellungsverfahren für Neurite bzw. Neurofibrillen ist. Durch Anwendung geeigneter Modifikationen lassen sich die meisten Zellstrukturen und insbesondere alle Arten von Fasern versilbern. Wenn nun, wie im Falle des vegetativen Nervensystems, schon durch zum Teil verhältnismäßig gering erscheinende Änderungen der Anwendungsweise das Silbernitrat recht unterschiedlich deutbare mikroskopische Präparate liefert,

so ist wohl die Frage berechtigt, was eigentlich durch das reduzierte Silber dargestellt wird.

Nach der von Liesegang (1911) begründeten Theorie beruht die Silberimprägnation vor allem auf dem Entstehen von Keimen aus reduziertem Silber an bevorzugten Orten (z. B. in Neurofibrillen), wenn man das Gewebe mit Silbernitrat behandelt. Diese Silberkeime werden dann mit einem Reduktionsmittel „entwickelt“, also durch Anlagerung weiterer Silberionen vergrößert und ergeben so die Schwärzung des betreffenden Gewebelements. Es ist auffallend, daß durch das reduzierte Silber vornehmlich Gebilde mit Faserstruktur distinkt dargestellt werden. Man wird also annehmen können, daß die Imprägnation durch Eigenschaften wesentlich beeinflusst wird, die allen Faserarten mehr oder minder gemeinsam sind. Diese Eigenschaften werden weniger auf chemischem Gebiet zu suchen sein, da die andersgearteten Funktionen z. B. von Retikulin- und Nervenfasern wohl auch einen Aufbau aus ganz verschiedenen chemischen Bausteinen mit infolgedessen auch anderen reaktionsfähigen Gruppen bedingen. Gemeinsamkeiten werden dagegen eher im strukturellen Aufbau der Fasern, also auf physiko- und kolloidchemischem Gebiet zu suchen sein. Die vorliegende Studie stellt einen Versuch dar, zur Aufklärung dieser Beziehungen beizutragen. Es sollen hauptsächlich physikochemische Faktoren untersucht werden, welche die Schwärzung eines histologischen Substrates durch reduziertes Silber zu fördern oder zu hemmen vermögen. Die Wichtigkeit rein chemischer Beziehungen darf darüber hinaus natürlich nie außer acht gelassen werden.

Als Grundlage der Untersuchung wurde die Bielschowsky-Methode zur Darstellung der Neurofibrillen in der Modifikation von Gros-Schultze (siehe Romeis, Mikroskopische Technik, 15. Aufl., München 1948, § 1793) gewählt. Es soll zunächst versucht werden, allgemeine Bedingungen aufzuzeigen, welche für die mehr oder weniger starke Silberschwärzung einer Struktur ohne vorhergehende Bekeimung verantwortlich zu sein scheinen. Erst dann werden die einzelnen Abschnitte der Silberimprägnation nach Gros-Schultze, d. i. Vorbad in Silbernitrat, Reduktion und Entwicklung in ammoniakalischer Silberlösung auf Grund eigener Versuche und auf Grund der Literatur besprochen. Zum Schluß wird dann auf die verwendeten Fixierungsmittel bzw. auf die durch sie gesetzten Veränderungen und auf die Gemeinsamkeiten im Faseraufbau zurückzukommen sein.

Allgemeine Bedingungen für das Zustandekommen einer Bräunung oder Schwärzung durch reduziertes Silber im histologischen Schnitt

Es ist bekannt, daß bei der Fixierung mit Formol dieses an die histologischen Strukturen in verschiedenem Ausmaß durch Adsorption gebunden wird. Beim Wässern können die Gewebeelemente das Formol wieder verschieden schnell und in wechselndem Ausmaß abgeben. Pischinger (1943) hat diese Verhältnisse untersucht und auch ein Verfahren angegeben, um mittels fuchsinchwefeliger Säure die Menge des von den Gewebeskolloiden abgegeben und damit reaktionsfähig werdenden Formaldehyds zu bestimmen. Von den Chemikern wird andererseits die ammoniakalische Silber-

lösung als Reagens auf Aldehyde verwendet. Sie wird von diesen, besonders in der Wärme, leicht zu metallischem Silber reduziert. Der Vergleich der durch gleichartige Anwendung beider Reagentien am histologischen Schnitt erzielten Bilder läßt einigen Aufschluß über den Einfluß der Gewebsstrukturen (besonders der submikroskopischen) auf das Zustandekommen der Silberschwärzung erwarten. Dieser Einfluß wäre auszuschließen, wenn die Orte stärkster Formolabgabe mit den Orten intensivster Silberbräunung bzw. Schwärzung übereinstimmen. Freilich muß dabei bedacht werden, daß durch das Schiffsche Reagens allein das Formol angezeigt wird, während die ammoniakalische Silberlösung natürlich auch von den Gewebeskolloiden als solche reduziert werden kann. Doch kann man sich an Hand der Unnaschen Kaliumpermanganatmethode mit einigen Vorbehalten ein allgemeines, grobes Bild über das Reduktionsvermögen der einzelnen Gewebsstrukturen machen. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser drei Methoden müßte also einige Hinweise auf physiko-chemische Faktoren ergeben, welche bewirken, daß durch reduziertes Silber eine Struktur dunkler als eine andere imprägniert wird.

Als Untersuchungsobjekte dienten Zungen von Meerschweinchen und Ratten, die verschieden lang — Wochen bis mehrere Monate — in Formol 1 : 4 fixiert und dann in fließendem und destilliertem Wasser gewässert wurden. 10–15 μ dicke Gefrierschnitte wurden anschließend jeweils in fuchsin-schwefeliger Säure, in frisch bereiteter ammoniakalischer Silberlösung und in Kaliumpermanganatlösung unter dem Deckglas eingeschlossen und mit Glaskitt umrahmt. Die Resultate wurden nach verschiedenen Zeiten abgelesen. Sie schwankten im einzelnen etwas je nach Tierart, Dauer der Fixierung, des Auswaschens und des Einschlusses in den Reagentien und hingen vor allem auch von der Temperatur ab. Doch ließen sich immerhin mittlere Werte erkennen, die gut zueinander in Beziehung gesetzt werden konnten.

Als Beispiel möge eine Tabelle folgen. Sie betrifft eine Rattenzunge; Fixierung: 5 Wochen Formol 1 : 4; Wässerung: 1½ Stunden in fließendem und 16 Stunden in zweimal gewechseltem destilliertem Wasser. 15 μ dicke Gefrierschnitte wurden bei ca. 40° eine Stunde lang in die oben genannten Reagentien eingeschlossen. Dann wurde das Ergebnis abgelesen; beim Kaliumpermanganatversuch wurde vor dem Mikroskopieren mit Aqua dest. durchgespült.

Die Tabelle zeigt, daß die Strukturen, die sich am stärksten mit dem Schiffschen Reagens gefärbt haben (Muskulatur, Erythrocyten), also am meisten Formol abgegeben haben, nicht identisch sind mit den Gewebselementen, die sich mit der ammoniakalischen Silberlösung am intensivsten gebräunt haben (Axone, Bindegewebsfasern).

Abb. 1 zeigt ähnliche Verhältnisse im Lichtbild bei der Meerschweinenzunge. Wenn die Schwarz-Weiß-Photos auch nicht die Unterschiede in den Farbtönungen wiedergeben können, so lassen sie doch wenigstens die Intensitätsunterschiede erkennen. Abb. 1a gibt das Ergebnis der Reaktion mit dem Schiffschen Reagens wieder. Am meisten Formol abgegeben haben die Erythrocyten und die quergestreiften Muskelfasern; dann folgen nach der Intensität der Rotfärbung: glatte Muskelfasern des Gefäßes, Axone des

markhaltigen Nerven und Bindegewebsfasern. Auch die Zellkerne geben nur eine geringe Reaktion mit der fuchsinschwefeligen Säure. Sie sind an den quergestreiften Muskelfasern bisweilen deutlich ausgespart (siehe Pfeile der Abbildung). Die Markscheiden des Nerven treten im Photo nur wegen ihres starken Lichtbrechungsvermögens so deutlich hervor. Im Präparat sind sie nur schwach und undeutlich hellrosa gefärbt. Abb. 1 b zeigt die Imprägnation nach Einschluf in ammoniakalischer Silberlösung. Hier haben sich die Axone am intensivsten dunkelbraun gefärbt. Es folgen mehr rotbraun die Zellkerne und Bindegewebsfibrillen, dann mehr braungelb in absteigender Reihe quergestreifte und glatte Muskelfasern und schließlich die

	Markscheiden	Axone	Quergestreifte Muskelfasern	Glatte Muskelfasern der Gefäße	Erythrocyten	Bindegewebsfibrillen	Gitterfasern	Zellkerne	Fettzellen
Schiff-sches Reagens	ganz schwach hellrosa 0 bis +	rot +++	dunkel-purpur-rot +++++	dunkel-rot ++++	dunkel-purpur-rot +++++	ganz schwach rosa +	nicht zu erkennen	verschieden, rosa + bis ++	rot-violett, in der Intensität stark wechselnd
Ammoniakalische Silberlösung	gelb ++	dunkel-braun ++++	hell gelb-braun ++	hellgelb +	meist ungefärbt	rot-braun ++++	schw.-braun +++	rot-braun + bis +++	meist ungefärbt oder schwach hellgelb
Kaliumpermanganat	schwarz-braun ++++	gelb ++	braun +++	braun +++	braun +++	gelb +	nicht zu erkennen	gelb +	schwarz-braun +++++

Die Zahl der Kreuze bezeichnet die Intensität der Färbung.

Erythrocyten. Auch in diesem Falle steht der Bräunungsgrad einer Struktur in keinem Zusammenhang mit ihrer Formolabgabe.

Man könnte nun annehmen, daß die Stellen stärkster Bräunung mit den Orten stärkster Reduktionskraft zusammenfallen; daß also z. B. bei den Axonen zu der nur mittelgroßen Formolabgabe noch ein beträchtliches Reduktionsvermögen der Neuriten selbst hinzutritt. Beide Wirkungen addieren sich und die Summe könnte das Reduktionsvermögen aller anderen Strukturen übertreffen. Das scheint aber ebenfalls nicht der Fall zu sein.

Gewiß ist die Prüfung des Reduktionsvermögens einer Gewebsstruktur, welche Unna (1911) angegeben hat, recht umstritten. Außerdem läßt sich KMnO_4 in wäßriger Lösung viel leichter reduzieren als die ammoniakalische Silberlösung. Dem läßt sich aber abhelfen. Man kann durch Veränderung des p_{H} der Kaliumpermanganatlösung ihre Oxydationskraft erhöhen oder

erniedrigen. So beträgt das Einzelpotential einer $n/1$ -Lösung von Kaliumpermanganat in $n/10$ -Borsäure (p_H 6) 0,9 Volt, was mit dem Potential des Silbers gut übereinstimmt (Wiberg 1943). Eine solche Lösung wurde zur Bestimmung des Reduktionsvermögens der Gewebsstrukturen verwendet.

Unna war nun der Auffassung, daß $KMnO_4$ von den Geweben zu Braunstein reduziert wird und daß demgemäß die am stärksten gebräunten Strukturen auch die größte Reduktionskraft besäßen; sie haben eben mehr $KMnO_4$ zu MnO_2 reduziert als die übrigen Gewebe. Demgegenüber hat Gutstein (1929, 1932) an Hand genauer Untersuchungen eingewendet, daß die Reduktion des Kaliumpermanganates nicht beim Braunstein stehen

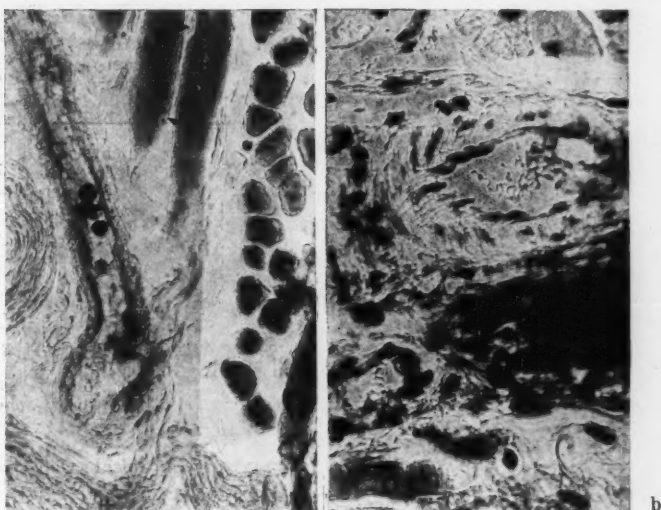


Abb. 1. Zunge des Meerschweinchens. Vergrößerung 385 : 1. a) Schiff'sches Reagens. b) Ammoniakalische Silberlösung.

bleibt, sondern bis zu farblosem Manganoxyd weitergeht. Nach dieser Deutung besäßen also gerade die fast nicht oder nur hellgelb gefärbten Strukturen die größte Reduktionskraft. Die Ansicht Gutsteins dürfte ein großes Maß an Wahrscheinlichkeit für sich haben. Wenn man zu einem mit Kaliumpermanganat gefärbten Schnitt am Rande des Deckglases ein starkes Reduktionsmittel zusetzt, etwa schwefelige Säure, dann sieht man mit dem langsamen Vordringen des Reduktionsmittels, daß zunächst die dunkelbraun gefärbten Strukturen (Markscheiden, Muskelfasern) zu dem helleren Gelb der Bindegewebsfibrillen entfärbt werden. Erst dann bläßt die Färbung aller Strukturen langsam und gleichmäßig ab. Es wird anscheinend zuerst der noch leichter reduzierbare Braunstein zu den höheren Reduktionsstufen, die das Bindegewebe gelb färben, reduziert, und erst dann schreitet die Reduktion zum farblosen MnO fort.

Wie dem auch immer sei, wenn man annehmen will, daß die Axone annähernd die stärkste Reduktionskraft unter allen Gewebeelementen haben, so müßten sie entweder nach der Ansicht Unnas dunkelbraun gefärbt sein oder nach der Deutung Gutsteins hellgelb. Das ist aber, wie obenstehende Tabelle zeigt, nicht der Fall. Die Intensität der Braunfärbung wird von den am meisten gebräunten Fettzellen und Markscheiden über Muskelfasern, Erythrocyten und Nervenaxone zu den Zellkernen und Bindegewebsfasern immer schwächer.

Nach dem Vorstehenden kann also weder eine größere Formolabgabe noch eine stärkere Reduktionskraft der Axone angenommen werden, um ihre intensive Bräunung nach der Silberbehandlung zu erklären.

Man könnte nun der Meinung sein, daß der verschiedene Bräunungsgrad der Substrate nach Behandlung mit ammoniakalischer Silberlösung wesentlich vom isoelektrischen Punkt der Gewebeelemente beeinflusst wird bzw. daß der verschiedene Ausfall der Reaktionen mit Schiffschem Reagens und ammoniakalischer Silberlösung auf eine Umladung der Substrate zurückzuführen sei. Das Schiffsche Reagens ist stark sauer (p_H ca. 2,5), die ammoniakalische Silberlösung stark basisch (p_H ca. 12,5). In diesem Falle müßten sich jedoch die Ergebnisse beider Reaktionen wie Positiv und Negativ zueinander verhalten. Das ist aber, wie Tabelle und Abbildungen deutlich zeigen, nicht der Fall. Auch der IEP der Substrate scheint keinen deutlichen Einfluß auf den Grad ihrer Silberbräunung zu haben. Dies zeigt Abb. 2. Sie stellt Epithel und angrenzendes Gebiet von der Oberseite der Meerschweinchenzunge dar. Abb. 2 a zeigt ein in Schiffsches Reagens eingeschlossenes Präparat. Das Stratum corneum, besonders auch die Zungenpapillen und die Muskulatur, zeigen die stärkste Formolabgabe. Dann folgen der Reihe nach Stratum germinativum und das Bindegewebe. Die Kerne sind, da sie scheinbar nur ganz wenig Formol abgeben, deutlich ausgespart. Abb. 2 b zeigt das Ergebnis eines ungefähr gleich langen Einschlusses in ammoniakalischer Silberlösung. Auffallend ist die starke Imprägnation der Zellkerne, besonders in den basalen Teilen des Epithels. Gegen die Oberfläche zu nimmt ihre Imprägnation ab. Das Zellprotoplasma der basalen Epithelschichten ist zart rotbraun imprägniert. Gegen die Grenze zum Stratum corneum wechselt die Imprägnationsfarbe über Gelbbraun in Gelb; in den näher der Oberfläche gelegenen Schichten des Stratum corneum nimmt sie ein Graugelb an, welches sich in den obersten Zellschichten und auch in Teilen der Zungenpapillen zu einem Grauschwarz intensiviert. Abb. 2 c gibt das Ergebnis einer Färbung mit auf p_H 4,6 gepufferten Methylenblau wieder. In Übereinstimmung mit den Befunden Zeigers (1936 a, b) sieht man, daß sich Kerne und Protoplasma der Epithelzellen bis genau an die Grenze des Stratum corneum gefärbt haben. Erst wieder die Papillenspitzen haben sich leicht bläulich tingiert. Die Lage des IEP unterliegt also einer jähen Verschiebung an der Grenze der beiden Epithellagen. Die verschiedenen Färbungen und Intensitäten der Imprägnation in ammoniakalischer Silberlösung zeigen dagegen fließende Übergänge.

Auch die Darstellung der Zellkerne mit reduziertem Silber scheint darauf hinzuweisen, daß die Lage des IEP keinen wesentlichen Einfluß auf den

Ausfall der Imprägnation unter den gegebenen Umständen hat. Abb. 3 zeigt die Kerne im unteren Teil des Stratum germinativum mit stärkerer Vergrößerung. Man sieht, daß sich die Chromiolen dunkelschwarzbraun, der „Kernsaft“ hellrotbraun, die Kernmembran aber überhaupt nicht imprägniert hat. Sie tritt nur durch ihr Lichtbrechungsvermögen etwas hervor. Bei der Färbung mit gestuft gepufferten Methylenblau beginnen sich dagegen Kernmembran und Chromatinschollen immer im gleichen p_H -Bereich zu färben; dies läßt auf gleiche Ladungsverhältnisse schließen. Wenn man darüber hinaus noch bedenkt, daß die Unterschiede in der Lage der isoelektrischen Punkte histologischer Substrate gegenüber der stark basischen ammoniakalischen Silberlösung (p_H ca. 12,3) relativ gering sind, so erscheint ein wesentlicher Einfluß des IEP recht unwahrscheinlich. Ein mit einer auf p_H 10 gepufferten Methylenblaulösung gefärbter Schnitt zeigt eine ziemlich einheitliche, tief dunkelblaue Färbung aller Substrate.

Aus Untersuchungen Lüp-
po-Cramers (1910) an photographischen Schichten und aus Modellversuchen Liesegangs (1900) wissen wir, daß die Farbe einer mit Silber imprägnierten Struktur von der Größe der in ihr enthal-

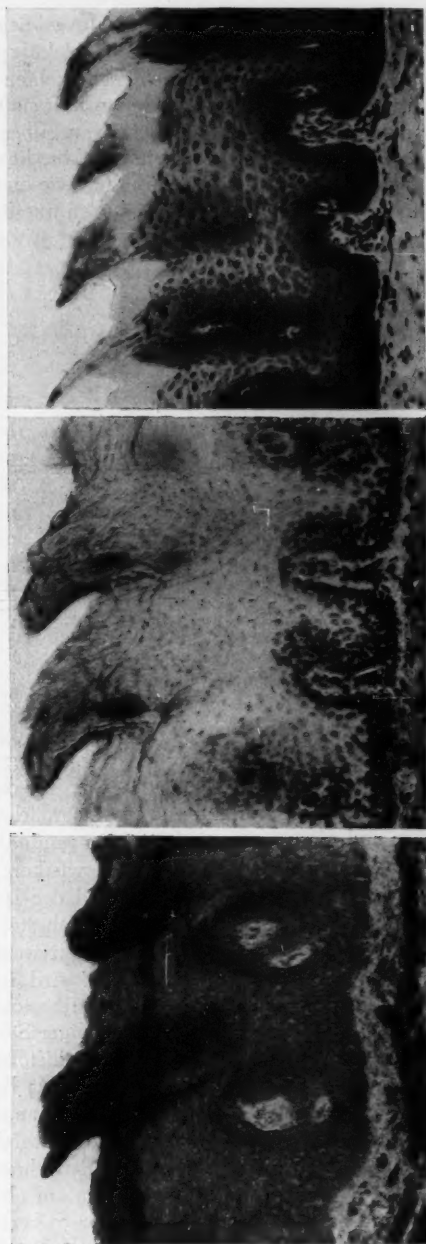


Abb. 2. Zunge des Meerschweinchens. Epithel und angrenzendes Gebit von der Oberseite. Vergrößerung 85:1. a) Schiff'sches Reagens. b) Gepuffertes Methylenblau, p_H 4,6. c) Ammoniakalische Silberlösung.

tenen Silberteilen abhängt. Je größer diese Silberteile werden (je mehr sie sich also von der Molekülgröße entfernen), um so dunkler und deckkräftiger wird die dem einzelnen Gewebeelement verliehene Farbe. Mit steigender Teilchengröße wechselt sie von Gelb über Orange, Rot, Braun nach Schwarz. Über den Gehalt an Silber sagt die Farbe aber direkt nichts aus. Eine gelb imprägnierte Struktur kann genau so viel (theoretisch auch sogar noch mehr) Silber enthalten wie eine schwarz tingierte; das Silber ist in der erstgenannten Struktur eben nur feiner verteilt (Zeiger 1938).

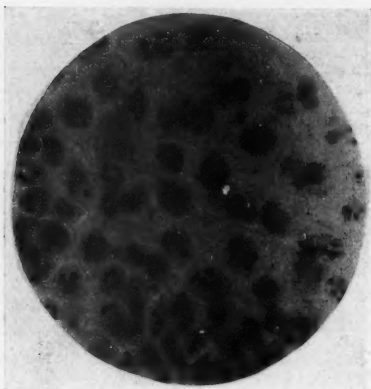


Abb. 3. Zunge des Meerschweinchens. Zellkerne des Stratum germinativum. Ammoniakalische Silberlösung. Vergrößerung 500:1.

Überträgt man die Imprägnationsfarben der Epithelzellen der Abb. 2b Rotbraun, Gelbbraun, Gelb und schließlich wieder mehr Gelbgrau in die dazugehörigen Teilchengrößen der Silberpartikel, so fällt eine gute Übereinstimmung mit den Dichteverhältnissen in mehrschichtigen Epithelien auf, wie sie Zeiger (1936a, b) ausgezeichnet beschrieben hat. Das Protoplasma der Epithelzellen wird um so dichter, je weiter sie von der Basis abrücken, und bekommt erst wieder in den oberflächlichsten Schichten eine etwas lockere submikroskopische Struktur. In gleicher Weise scheint sich, wie auf Grund der Imprägnationsfarbe angenommen werden kann, die Teilchengröße der Silberpartikel zu ändern.

Von der Epithelbasis zur Oberfläche wird diese zunächst immer kleiner und nimmt erst wieder in den randnahen Teilchen etwas zu. Es scheint also ein direkter Zusammenhang zwischen Strukturdichte bzw. zwischen der Weite der Intermicellarräume und der Imprägnationsfarbe, also der Teilchengröße des reduzierten Silbers zu bestehen. Diese Vermutung kann leicht durch einen Modellversuch unterbaut werden.

10-, 20- und 40%ige Gelatine wird in Formol 1:4 fixiert, kurz ausgewaschen und auf dem Gefriermikrotom ca. 35μ dick geschnitten. Die Schnitte werden in fuchsin-schwefeliger Säure und in ammoniakalischer Silberlösung genau wie vorher die histologischen Präparate bei 37° eingeschlossen. Nach 1–2 Stunden ist das Resultat deutlich abzulesen; es ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben. Die Farbtöne sind mit den Bezeichnungen der Ostwaldschen Farbentafeln angegeben.

Die 40%ige Gelatine gibt entsprechend ihrer Dichte am meisten, die 10%ige Gelatine am wenigsten Formol ab. Die Imprägnationsfarben nach Behandlung mit ammoniakalischer Silberlösung verhalten sich fast gegensätzlich. Der Farbton wechselt in diesem Fall von einem schwachen, hellen

Schwärzlichgrau der 10%igen Gelatine über ein sehr intensives Schwarzbraun der 20%igen Gelatine zu einem wieder etwas weniger intensiven Rotbraun der 40%igen Gelatine.

Da in diesem Versuch die einzelnen Gelatineschnitte sich nur in ihrer Dichte unterscheiden und im übrigen ganz gleich behandelt wurden, kann die Verschiedenheit der Imprägnationsfarben und damit die verschiedenen Teilchengrößen des niedergeschlagenen Silbers nur auf die unterschiedlichen Dichten der Schnitte bzw. auf Faktoren, die von der Dichte abhängen, zurückgeführt werden. Die Größe der Silberpartikel scheint um so größer zu werden, je weniger dicht die Gelatine ist. Auffällig dabei ist die relativ intensivste Imprägnation der 20%igen Gelatine.

	Gelatine		
	10 %	20 %	40 %
Schiffssches Reagens	na 9, veilrosa schwach	pa 10, veilrot intensiv	pa 11, vell sehr intensiv
Ammoniakalische Silberlösung	ni 5, schwärzlichgrau ganz schwach	pi 6, schwarzbraun sehr intensiv	ne 5, rotbraun intensiv

Man könnte nun glauben, daß durch das reduzierte Silber einfach die Intermicellarräume ausgefüllt werden, wenn nur ein geeignetes Reduktionsmittel anwesend ist. So einfach darf der verwickelte Vorgang der Silberimprägnation aber sicher nicht aufgefaßt werden. Auf die scheinbar recht komplizierten chemischen Vorgänge der Keimbildung und der Keimvergrößerung wird erst im nächsten Abschnitt eingegangen. Hier kam es zunächst darauf an, zu zeigen, daß Farbe und Intensität einer Silberimprägnation weder so sehr von dem Reduktionsvermögen bzw. der Formelabgabe noch von der Lage des IEP abzuhängen scheinen, sondern zumindest in großem Ausmaß von der Dichte der Struktur beeinflusst werden können. Es dürfte die Weite der Interfibrillarräume für die Größe der entstehenden Silberpartikelchen innerhalb gewisser Grenzen maßgebend sein; submikroskopisch lockerer strukturierte Gebilde imprägnieren sich dementsprechend mit dunklerer Farbe als dichter strukturierte. Dies gilt natürlich nur, solange es sich um reine Imprägnation — „Durchtränkung“ — mit reduziertem Silber handelt. Sobald zu der Imprägnation noch Inkrustation, also „Auflagerung“ von Silberteilen hinzutritt, müssen sich die Verhältnisse wesentlich verschieben.

Auch in der Literatur findet man einige Angaben über die große Bedeutung der Intermicellarräume für den Ausfall der Silberreaktion. W. v. Möllendorff (1932) äußert die Vermutung, daß der Ausfall der Silberimprägnation von Bindegewebsfibrillen eine Frage der Interfibrillarräume ist. Nach seiner Ansicht könnte eine dickere Packung (Entquellung) die Imprägnation verhindern. Jalowy (1938) hat dann in dieser Hinsicht die Versilberung kollagener, elastischer und argyrophiler Fasern untersucht. Anschließend an die Beobachtung Heringas (1933), daß kollagene Fi-

brillen unter dem Einfluß einer Entzündungsinfiltration besonders in Zellnähe reversible argyrophile Eigenschaften annehmen können, untersuchte er die Zusammenhänge von Kollagen, Elastin und Retikulin hauptsächlich auf Grund ihrer verschiedenen Affinität zu Silber.

Er fand durch Färbungsversuche mit verschiedenen dispersen Farbstoffpaaren, daß Retikulinfasern lockerer strukturiert sein müssen als kollagene Fibrillen; auch die argyrophilen Abschnitte kollagener Fibrillen in Entzündungsherden sind nach seinen Untersuchungen in ihrer Ultrastruktur deutlich aufgelockert. Eine Entbündelung des Kollagens, wie sie bei Lichen sclerosus vorkommt, führt dagegen zu keiner erhöhten Argyrophilie, da sie die Ultrastruktur der kollagenen Fibrillen nicht zu verändern scheint. Die Färbungsversuche Jalowys sind allerdings anfechtbar, da sie die Ladungsverhältnisse zwischen Farbionen und Substrat überhaupt nicht berücksichtigen. Sie finden aber durch den oben beschriebenen Gelatine-Modellversuch eine gewisse Stützung. In ähnlicher Weise haben Seki (1940) und Weber (1947) auf die Bedeutung der Intermicellarräume für die Imprägnation der Neurofibrillen hingewiesen.

Im Zusammenhang mit dem oben erwähnten Gelatine-Versuch sei noch auf die Gefahr hingewiesen, Reaktionen mit Silbersalzen, die in der Eprouvette regelmäßig und einwandfrei ablaufen, ohne weiteres auf den histologischen Schnitt zu übertragen. Schiffisches Reagens und ammoniakalische Silberlösung sind beide in der Eprouvette einwandfreie Reagentien auf Aldehyde und doch zeigen sie scheinbar den Formolgehalt im Gelatineschnitt ganz verschieden an. Man wird bei jeder chemischen Reaktion, die mit Silbersalzen am histologischen Schnitt ausgeführt wird, an den maßgeblichen Einfluß der submikroskopischen Struktur des Substrates denken müssen. Auch soll nochmals betont werden, daß aus der Farbtonung der Imprägnation allein kein sicherer Schluß auf die Menge des niedergeschlagenen Silbers möglich ist. Bei Beachtung dieser Tatsachen wären vielleicht die überraschenden Befunde Alsterbergs (1948) einer anderen Deutung zugänglich. Der Autor benutzt eine Lösung von Jodzyanid und Silberchlorat in destilliertem Wasser. Wie er in Reagensglasversuchen festgestellt hat, ermöglicht diese eine Imprägnation, welche die Doppelbindungen ungesättigter Phosphatide, besonders des Lezithins und des Kolaminkephalins, trifft. Auf Grund der durch diese Imprägnierungsflüssigkeit erzielten Bilder kommt Alsterberg nun zur Ansicht, daß die Markscheiden arm, die Axone dagegen reich an Phosphatiden sind und daß die „Myelinformen“ daher nicht von den Markscheiden, sondern von den Achsenzylindern gebildet werden. Coronini (1949) hat sich dieser Behauptung angeschlossen; Bejdl (1950) hat sie erst kürzlich zurückgewiesen.

Vorbad in Silbernitrat und Keimbildung

Nach der Fixierung in Formol wird bei der Bielschowsky-Imprägnation der Gewebsblock einer mehrstündigen Wässerung in fließendem und destilliertem Wasser unterzogen. Diese Wässerung vermag einerseits frei bewegliche Ionen aus dem Block zu entfernen — wirkt also wie eine Dialyse —,

andererseits werden aber auch gewisse Stoffe, Spaltprodukte von Eiweißen und Lipoiden, die durch die Fixierung gebildet werden, ausgespült werden können. Formol gilt als guter Lipoidstabilisator; doch hydrolisiert es nach den Feststellungen Weils (1930) immerhin die Phosphatide und macht aus ihnen Phosphorsäure frei. Cholesterin und Cerebroside werden dagegen nicht wesentlich verändert. Daneben muß man noch die geringe Fixierungsstabilität nach Formolfixierung (Zeiger 1949) bedenken; durch die lange Wassereinwirkung wird es also zu Quellungen und vielleicht auch zu geringer Mazeration kommen können. Alles in allem dürfte der Gewebsblock durch die Wässerung von beweglichen Ionen und durch die Fixierung gebildeten Gewebsspaltprodukten befreit werden, die eine reguläre Versilberung zu verhindern scheinen. Die Ionen könnten durch Bildung von Silber-salzen (z. B. Silberchlorid) zu Silberniederschlägen an unerwünschten Orten führen. Die Spaltprodukte könnten die submikroskopischen Intermicellarräume verlegen, in denen sich die Silberimprägnation vollziehen dürfte.

Gefrierschnitte von dem gewässerten Gewebsblock werden nun in 20%ige Silbernitratlösung eingelegt. In diesem Vorbad vollzieht sich nach allgemeiner Ansicht die Bildung von Keimen aus reduziertem Silber an bevorzugten Orten. Über die Ursachen der Keimbildung sind schon recht viele Ansichten entwickelt worden, die von Zeiger (1938) und zuletzt auch von Palmgren (1948) ausführlich zusammengestellt worden sind. Zur Untersuchung der Faktoren, welche die Keimbildung beeinflussen, dienten Nervus ischiadicus und N. lialis vom Rind, welche in Formol 1 : 4 fixiert wurden.

Legt man ordnungsgemäß gewässerte Gefrierschnitte vom Rinder-Ischiadicus in die Silbernitratlösung ein, so bräunen sich die Neurite makroskopisch schon nach wenigen Minuten. Es sind also Silberkeime entstanden, die bereits mit freiem Auge sichtbar sind.

Wenn man die Vorgänge der Keimbildung erklären will, hat man zu bedenken, daß Silbernitrat mindestens zum Teil hydrolytisch gespalten ist, daß also neben Ag-Ionen auch AgOH in der Lösung vorhanden ist. Weiter hat man in Betracht zu ziehen, daß die AgNO₃-Lösung der Photolyse unterliegt; es entsteht in ihr durch Belichtung eine geringe Menge reduzierten Silbers auch in der braunen Flasche. In dieser Hinsicht ist es interessant, daß von manchen Autoren die Verwendung alter Silbernitratlösungen zur Bekeimung vorgeschlagen wird und daß Palmgren (1948) bei seiner gut ausgearbeiteten Methode der Silbernitratlösung geringe Mengen Glycin zusetzt, um es auf neutral zu puffern. Glycin ist aber ein Reduktionsmittel, welches bewirken kann, daß auch in der frisch bereiteten AgNO₃-Lösung geringe Mengen reduzierten Silbers vorhanden sind.

Im ersten Stadium der Silbernitrateinwirkung auf das Gewebe wird man mit der Wanderung der Silberionen auf Grund elektrostatischer Beziehungen zu rechnen haben. Als erster hat darauf schon R. Keller (1925) hingewiesen. Durch die Untersuchungen Pischingers (1926, 1927) sind die Ursachen des Haftens von Ionen an histologischen Substraten geklärt worden. Es finden elektrostatische Adsorptionen in wechselndem Ausmaß statt. Danach ist die Haftung eines Ions um so größer, je größer die Differenz zwischen der Lage des IEP des Substrates und dem p_H der verwendeten

Lösung ist. Die IEP der Neurofibrillen liegt nach der zur Imprägnation nötigen Vorbehandlung etwas schwankend je nach der Art des Nerven (markreich oder markarm), nach der Dauer der Vorbehandlung und nach der Tierart bei etwa p_H 5,0, also relativ nahe dem Neutralpunkt. Schon daraus geht hervor, daß elektrostatische Adsorption nicht das Wesentliche der Keimbildung sein kann, wie es Okino (1934) und Klein und Missriegler (1935) angenommen haben. Die primäre Silberadsorption müßte an den meisten anderen histologischen Strukturen wegen der Lage ihres IEP stärker als an den Neurofibrillen sein. (Liesegang [1935] hat diese Deutungsversuche der beiden Autoren schon auf Grund anderer Überlegungen widerlegt.) Die Wasserstoffionenkonzentration der verwendeten $AgNO_3$ -Lösung vermag aber natürlich die für die Keimbildung scheinbar nötige primäre Adsorption von Silberionen zu beeinflussen. Wenn das p_H des $AgNO_3$ -Bades niedriger ist als das p_H des IEP der Neurofibrillen, so wird die primäre Silberionenadsorption unterbunden. Von der Bedeutung dieses Vorganges kann man sich leicht überzeugen, wenn man als Vorbad verschieden stark mit HNO_3 angesäuerte Silbernitratlösungen verwendet. Mit steigender Ansäuerung wird die sichtbare Bräunung (= Keimbildung) in den Ischiadicusneuriten immer geringer. Freilich muß man dabei bedenken, daß sich bei der Ansäuerung auch die Hydrolysenkonstante ändert¹.

Doch bleibt es bei der Keimbildung nicht bei einer lockeren physikochemischen Adsorptionsbindung. Die Silberionen müßten sonst durch langdauerndes Wässern wieder zu entfernen sein. Die Bräunung der Ischiadicusneurite wird dagegen durch dieses Vorgehen nicht beeinflusst. Es muß also eine Silber-Eiweiß-Verbindung entstanden sein. An welchen besonderen Gruppen der Seitenketten von Eiweißmolekülen in den Neurofibrillen diese Bindung stattfindet, möge hier dahingestellt bleiben. Um so mehr, als ähnliche Vorgänge wie in den Neurofibrillen auch in anderen Gewebstrukturen stattzufinden scheinen; auf die Verteilung der Silberkeime wird anschließend zurückzukommen sein.

Silberalbuminate sind nach den Untersuchungen von Jalowy und Chrzanowski (1939) farblos und nicht wesentlich lichtempfindlich. Es macht daher auch keinen sichtbaren Unterschied, ob man die Bekeimung in Silbernitrat im Dunklen, bei diffusem Tageslicht oder bei künstlichem Licht vornimmt; darauf hat auch schon Palmgren (1948) hingewiesen. Da die Silberalbuminate farblos sind, die Ischiadicusschnitte sich aber im Vorbad bräunen, muß man annehmen, daß Reduktion stattfindet. Als reduzierendes Agens kommt zunächst die Reduktionskraft der Neurofibrillenbausteine, dann aber auch der nach der Fixierung aus den Geweben wieder frei werdende Formaldehyd in Betracht. Namentlich letzterer scheint eine wesentliche Rolle zu spielen. Bringt man einen Ischiadicusschnitt vor der $AgNO_3$ -Behandlung nur eine halbe bis eine Stunde in destilliertes Wasser bei 50 Grad, so gibt er einen Großteil seines abspaltbaren Formols ab. Bringt

¹ Die Studien von Silver (1942) und Holmes (1943), die sich ebenfalls mit dem Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration beschäftigen, sind mir trotz aller Bemühungen leider nicht zugänglich geworden.

man anschließend den gleichen Schnitt in das Silbernitratbad, so merkt man, daß die Bräunung der Neurite nur mehr in wesentlich geringerem Ausmaß zustande kommt. In gleicher Weise bleibt auch diese sichtbare Bräunung ganz oder zum größten Teil aus, wenn man alkoholfixierte Ischiadicusneurite mit Silbernitrat behandelt. Bei diesem Versuch ist allerdings zu bedenken, daß es in warmem destilliertem Wasser neben der Formolabgabe zu stärkerer Quellung, bei der Alkoholfixierung dagegen zu Schrumpfungen kommt; auch bei der Bekeimung scheint die Porenweite der submikroskopischen Spalträume eine gewisse Rolle zu spielen.

Es soll nicht geleugnet werden, daß auch das Redoxpotential der Gewebeskolloide, vielleicht auch der Lipoide, nicht unwesentlich ist, doch scheint diese gegenüber der Formolwirkung von geringerer Bedeutung zu sein. In den meisten vorgeschlagenen Fixierungsflüssigkeiten für Silberimprägnation ist Formol enthalten; mit reinem Alkohol wird kaum jemals fixiert. Meist werden dem Alkohol OH-Ionen zugesetzt (Cajal, Perez, Okada u. a.), so daß auch ein anderer Bildungsschemismus der Silberkeime denkbar wäre.

Mit der primären Adsorption der Silberionen, ihrer chemischen Reaktion mit dem Eiweiß und der Reduktion der entstehenden Verbindungen scheint aber der Vorgang der Keimbildung noch nicht abgeschlossen zu sein. Durch die Reaktion mit Silber müssen die Eiweißstrukturen, wenigstens zum Teil, ihre elektrostatischen Eigenschaften ändern. Wenn man nun bedenkt, daß in der Silbernitratlösung neben Ag-Ionen noch Silberhydroxyd und metallisches Silber in kolloider Verteilung vorhanden sind, so besteht die Möglichkeit, daß sich Silberhydroxyd auf Grund seiner Dipoleigenschaften bzw. kolloides negativ geladenes Silber abwechselnd zu größeren Komplexen aneinander lagern; einerseits an das zuerst gebildete Silberalbuminat, andererseits an die freien Dipole und Nebenvalezen der entstehenden Komplexe. Gleichzeitig scheint die Reduktion fortzuschreiten. Diese Vorgänge kommen nach einer gewissen Zeit zum Stillstand. Eine Verlängerung der Silbernitratbehandlung vermag die Bräunung der Neurite nicht sichtbar weiter zu intensivieren.

Der komplexe Aufbau der in den Ischiadicusneuriten entstehenden Silberkeime scheint aus ihrem Verhalten gegenüber Lösungsmitteln für Silbersalze und metallisches Silber hervorzugehen. Sie lösen sich innerhalb weniger Minuten in 3%iger KCN-Lösung, welche Silbersalze und metallisches Silber durch Komplexbildung in Lösung bringt; innerhalb etwa einer Stunde in 5%igem Ammoniak; innerhalb mehrerer Stunden in Natriumsulfat und schließlich in geringstem Ausmaß in 5%iger Salpetersäure. Auch die bei Erhöhung der Temperatur beträchtlich kürzeren nötigen Imprägnationszeiten könnten, abgesehen von der allgemeinen Beschleunigung chemischer Reaktionen in der Wärme, eventuell für eine Mitbeteiligung von Silberhydroxyd an der Keimbildung sprechen. Die Hydrolysenkonstante wächst mit steigender Temperatur.

Wie gesagt, nimmt die Bräunung der Ischiadicusneurite im Silbernitratbad nur bis zu einer gewissen Grenze zu und bleibt dann scheinbar stehen. Die Bindegewebsfibrillen um die Neurite bleiben ungefärbt oder nehmen

nur einen ganz schwachen, kaum merkbaren gelben Farbton an. Es scheint daher notwendig, die Verteilung der Silberkeime in verschiedenen Geweben mit feineren Methoden nachzuweisen.

Die Untersuchungsobjekte waren wieder Zungen von Meerschweinchen und Ratten und der Ischiadicus und Milznerv des Rindes. Zum Nachweis der Keimverteilung dienten zwei Methoden. Bei beiden werden die entsprechend vorbehandelten Schnitte zunächst dem Silbernitratbad während verschiedener Zeit ausgesetzt und dann einer langdauernden Wässerung mit destilliertem Wasser, dem eventuell auch etwas Alkohol zugesetzt wird, unterzogen. Dadurch gelingt es, alle noch frei beweglichen Silberionen aus dem Schnitte zu entfernen.

Bei der ersten Nachweismethode für Silberkeime werden darauf die Schnitte im Muffelofen verascht; anschließend wird der Aschenrückstand vorsichtig mit einem leicht modifizierten physikalischen Entwickler nach Feigl (1947) entwickelt. (Der Entwickler besteht aus 1 g Methol, 5 g Zitronensäure, 4 g Gummi arabicum auf 50 cm³ Aqua dest. Vor Gebrauch wird zu 10 cm³ Entwicklerlösung 0,4 cm³ m/10 AgNO₃-Lösung zugesetzt.) Die Gefrierschnitte zum Veraschen werden in Serie hergestellt und abwechselnd der eine verascht, der andere zur Orientierung mit Simultan-Gewacin gefärbt.

Als zweite Methode wurde der von Okamoto, Utamura und Akagi (1939) für histologische Zwecke adaptierte Silbernachweis mit *p*-Dimethylaminobenzylidenrhodamin² nach Feigl verwendet.

Beide Methoden ergeben ungefähr gleiche Resultate, doch sind die mit der zweiten Methode gefundenen etwas klarer. Das Vorhandensein von Silber konnte in allen untersuchten Geweben in wechselndem Ausmaß nachgewiesen werden. Jene Gewebe, die auch beim Einschluß in ammoniakalischer Silberlösung am intensivsten gebräunt werden, also markhaltige Nerven des Zungengrundes (besonders ihre Markscheiden), gewisse Teile der Zungenpapillen und die oberflächlichsten und basalsten Lagen des Epithels scheinen besonders zur Bildung von Silberkeimen befähigt zu sein. Muskelfasern und Bindegewebsfibrillen enthalten dagegen weniger Silberkeime. Für die Menge der entstehenden Keime scheint die Dauer des Vorbades in Silbernitrat nicht von wesentlicher Bedeutung. Im allgemeinen wurden die Schnitte 10 Minuten, 1 und 2 Stunden dem AgNO₃ ausgesetzt. Die relativen Unterschiede in der Rotfärbung der einzelnen Gewebelemente nach der Feiglschen Farbreaktion bleiben dabei ungefähr gleich. Insgesamt gibt der Schnitt allerdings eine etwas intensivere Reaktion, je länger er mit Silbernitrat behandelt wird. Die Meinung Palmgrens, daß es bei zu langer Dauer des Vorbades zu einer Art „Überbelichtung“ kommt, scheint nicht ganz zutreffend zu sein. Silberkeime allein in Nervenfasern konnten mit den beiden genannten Methoden nie festgestellt werden. Dagegen ist es zweifellos sicher, daß der Ausfall einer Silberimprägnierung wesentlich von der

² Das Reagens verdanke ich der außerordentlichen Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Dr. Hüttig und Herrn Dr. Limonscheff von der technischen Hochschule in Graz, denen an dieser Stelle nochmals besonders gedankt sei.

Dauer der vorangehenden Silbernitratbehandlung abhängt; diese soll nicht über das nötige Maß hinausgehen. Doch scheint dabei nicht so sehr das Entstehen von zuviel Silberkeimen in nicht-nervösen Geweben die Ursache zu sein.

Wenn man Schnitte vom Nervus lienalis für 10 Minuten und für 1 Stunde mit Silbernitrat behandelt, anschließend nur ein oder zwei Stunden mit destilliertem Wasser auswäscht, verascht und schließlich physikalisch entwickelt, macht man die Beobachtung, daß die Schnitte, welche nur kurze Zeit bekeimt wurden, rascher bei der Entwicklung „kommen“ als die länger bekeimten. (Freilich tritt das nicht immer ganz regelmäßig ein. Wenn man den Versuch öfter wiederholt, kann das Phänomen auch einmal ausbleiben.) Spült man dagegen nach dem Vorbad sorgfältig 24 Stunden in oft gewechseltem Aqua dest., so „kommt“ bei der Entwicklung zuerst der länger bekeimte Schnitt. Wenn man bedenkt, daß die 20%ige Silbernitratlösung stark entquellend wirkt, könnte man dieses gegensätzliche Verhalten vielleicht in folgender Weise erklären. Bei der kurzdauernden Silbernitratbehandlung werden die Hydratationshüllen um die submikroskopischen Gewebestrukturen nur wenig verändert. In die Wasserhüllen treten während des Verweilens des Schnittes im Vorbad Silberionen in reichlicher Menge ein; diese werden im Hydratationswasser festgehalten und können durch kurzes Auswaschen nicht entfernt werden. Bei langer Silbernitrateinwirkung werden die Hydratationshüllen bis auf einen geringen Rest desintegriert, so daß nur eine geringe Anzahl von Ag-Ionen in ihnen festgehalten werden kann. Bei der Veraschung werden diese innerhalb der Hydrathüllen beweglichen Ag-Ionen oxydiert und anschließend zusammen mit den Silberkeimen entwickelt. Es wäre nun möglich, daß bei der auf das Vorbad folgenden Reduktion gerade diese an die Strukturen schon lose gebundenen, aber an ihnen verschieblichen Silberionen verwendet werden, um die bestehenden Silberkeime zu vergrößern.

Es bleibt nun die Frage, warum im Nerven mehr Silberkeime gebildet werden als in anderen Geweben. Eindeutig kann sie auf Grund unserer Versuche noch nicht entschieden werden, doch scheint auch hier die Weite der Intermicellarräume eine gewisse Rolle zu spielen. Die Neurite des Rinderischiadicus bräunen sich schon nach kurzer Behandlung mit AgNO_3 . Beim Nervus lienalis des Rindes bleibt diese Erscheinung aus; die Neurite werden nur schwach gelblich. Man könnte nun annehmen, daß im Lienalis wesentlich weniger absaltbares Formol vorhanden sei und daß daher die Reduktion der entstehenden Silbersalzkomplexe nur so gering sei, daß sie zu gelblichen Farbtonungen führe. Das scheint aber nicht der Fall zu sein. Der Formaldehydnachweis mit Schiffchem Reagens fällt beim Nervus lienalis nur um ein Geringes schwächer aus als beim Nervus ischiadicus. Es liegt nun nahe, wieder an eine Funktion der Porenweite zu denken. Die submikroskopischen Räume könnten entweder so eng sein, daß sie die Größe von Silberpartikelchen, welche eine Bräunung hervorrufen, nicht zulassen, oder aber sie könnten auch zu weit sein. Das letztere scheint in diesem Falle die Ursache zu sein. Führt man an einer Reihe von Schnitten des N. lienalis die ganze Imprägnation durch und variiert dabei die Zeiten des Vorbades,

so sieht man, daß nur bei einer etwa halbstündigen Verweildauer im AgNO_3 schöne Resultate erzielt werden. (Diese Zeit gilt natürlich nur für den von uns verwendeten Gewebsblock.) Bei längerem oder kürzerem Vorbad wird die Imprägnation unvollständig und fleckig.

Im Silbernitrat unterliegen die Gewebe einer Entquellung und Schrumpfung. Es könnte sein, daß gerade nach einer halben Stunde die submikroskopischen Spalträume in den Lialisneuriten eine förderliche Größe angenommen haben, welche die Entstehung und das Haften der Silberkeime begünstigt. Daß trotzdem die Bräunung ausbleibt, könnte dadurch seine Erklärung finden, daß das zur primären Reduktion hauptsächlich nötige Formol schon vor dem Erreichen der richtigen Porengröße durch die starke Dehydrationswirkung des Silbernitrates freigemacht worden ist.

Es scheint, daß die besonderen Bedingungen in engsten Spalträumen den Aufbau der Silberkeime, vielleicht infolge von Oberflächenwirkungen, begünstigen; zu enge oder zu weite Intermicellarräume dürften die genügende Bildung von Silberkeimen verhindern können. In dieser Hinsicht soll auch darauf hingewiesen werden, daß die Bildung von Silberkeimen allein nicht genügt; sie müssen bei der Weiterbehandlung mit den verschiedenen Reagentien in den Strukturen, in denen sie gebildet wurden, auch haften bleiben.

Reduktion und Entwicklung

Zur Reduktion kommt bei der Gros-Schultze-Imprägnation der Schnitt aus dem Vorbad direkt in Formol 1:4. Abb. 4 zeigt Neurite des Rinderischadicus. In Abb. 4a sind Schnitte nach der Silbernitratbehandlung, in Abb. 4b nach der anschließenden Reduktion photographiert. Man sieht, daß die von den Silberkeimen im Vorbad hervorgerufene Bräunung sich sowohl auf die Axone als auch, in etwas geringerem Ausmaß, auf die Markscheiden erstreckt. Die ganze Nervenfasern erscheint im Photo mehr minder einheitlich grau. Nach der Reduktion (Abb. 4b) präsentieren sich die Axone viel dunkler braun und sind gegen die deutlich heller gewordenen Markscheiden distinkt abgesetzt. Es kommt also im Formol zu einer weiteren Reduktion der Silberkeime und gleichzeitig durch Anlagerung neuer Silberionen bis zu einem gewissen Grad auch zu einer Vergrößerung der in den Strukturen enthaltenen Silberpartikelchen. Dabei scheinen die in den Hydrationshüllen der Gewebelemente festgehaltenen Ag-Ionen, auf die schon hingewiesen wurde, eine besondere Rolle zu spielen. (Es sei hier auf die eingehende Darstellung des Reduktionsprozesses von Palmgren (1948) verwiesen, dessen Ergebnisse voll bestätigt werden können.) Während sich bei der Reduktion die Depots an reduziertem Silber in den Axonen vergrößern, verschwindet die Bräunung der Markscheiden zu einem großen Teil. Nach diesem Befund muß man wohl annehmen, daß schon entstandene Silberkeime nicht immer unbedingt festhaften, sondern auch wieder verschwinden können; sei es, daß nur lose haftende Silberkeime bei der Reduktion an andere größere Keime in der Nachbarschaft angelagert werden, sei es, daß sie durch die vom Reduktionsmittel bewirkten Diffusionsströme ausgespült werden. In dieser Hinsicht ist es auffällig, daß in den randnahen Teilen des Schnittes, dort, wo die Diffusionsströme am stärksten sind, die Imprägnation nach

Gros-Schultze oft blaß und unregelmäßig ausfällt. (An den Rändern eines Schnittes kann das Reduktionsmittel von drei Seiten eindringen.) Es scheint also zu einer vollständigen Imprägnation nötig zu sein, daß nicht nur Silberkeime gebildet werden, sondern daß sie auch in den Strukturen, in denen sie gebildet worden sind, haften bleiben. Allem Anschein nach ist das um so weniger der Fall, je lockerer eine Struktur gebaut ist. Die günstigsten Voraussetzungen für eine vollständige Versilberung dürfte demnach ein Gewebeelement bieten, dessen Interfibrillarräume möglichst weit sind, um möglichst große teilweise reduzierte Silbersalzkomplexe (= Silberkeime) aufnehmen zu können, dessen Intermicellarräume aber andererseits gerade noch eng genug sind, um das Haften der Silberkeime zu gewährleisten. Ist ein Gewbelement dicht strukturiert, so wird es nach der Reduktion nur geringe Silbermengen enthalten. Andere, lockerer gebaute Strukturen mit großem Gehalt an reduziertem Silber werden bei der nachfolgenden Entwicklung das naszierende Silber in größerem Ausmaß an sich ziehen können und dann stärker und dunkler imprägniert erscheinen. Überschreitet die Weite der submikroskopischen Poren aber eine gewisse Grenze, so werden die entstandenen Silberkeime nur eine geringe Haftfestigkeit haben und den auftretenden Diffusionsströmen zum Opfer fallen. Eine solche Struktur wird sich nur schwach und ungleichmäßig imprägnieren können.

Nach der Reduktion kommen die Schnitte zur „Entwicklung“ in ammoniakalischer Silberlösung; dabei nimmt der Schnitt, da er vorher nicht durch Wasser gezogen wird, eine reichliche Menge von Formaldehyd mit. Das Formol vermag die ammoniakalische Silberlösung zu reduzieren, und so entsteht in und um den Schnitt naszierendes Silber. Die Menge des entstehenden Silbers hängt wohl von der Art der Bereitung der ammoniakalischen Silberlösung ab. Je mehr überschüssiger Ammoniak in der Lösung vorhanden ist, um so weniger naszierendes Silber wird entstehen. Gleichzeitig ist zu bedenken, daß Ammoniak die Silberkeime bis zu einem gewissen Grad zu lösen vermag. Das naszierende Silber wandert besonders zu den Strukturen, welche bereits die reichlichsten Depots an reduziertem Silber enthalten, lagert sich an die schon bestehenden Silberkeime an und vergrößert diese. Dabei werden Silberkeime in jenen Gewbelementen besonders rasch heranwachsen können, deren Intermicellarräume leicht zugänglich sind. Die submikroskopischen Spalträume in diesen Strukturen werden früher mit reduziertem Silber ausgefüllt sein als die anderer Strukturen, die

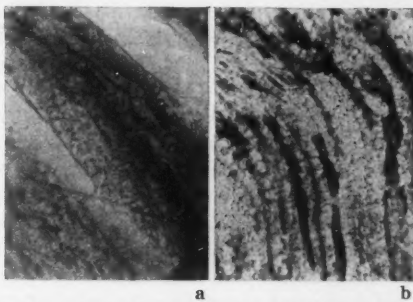


Abb. 4. Neurite des Rinderischadicus. Vergrößerung 385 : 1. a) nach dem Vorbad; b) nach der Reduktion.

von vornherein weniger Silberkeime enthalten und deren Interfibrillarräume dem Wachstum der Silberkeime ungünstige Bedingungen bieten. Wenn man in diesem Zeitpunkt die Imprägnation unterbricht, so zeigen die Neurite positiven Faserdichroismus, der allerdings nur schwach ist. Er beweist aber, daß die Silberdepots und damit die Intermicellarräume und Micellen parallel zur Neuritachse ausgerichtet sind. Baud (1947/48) hat dies ebenfalls an Hand der Weberschen Imprägnationsmethode festgestellt.

In den meisten Fällen wird aber die Entwicklung nicht schon in diesem Augenblick unterbrochen, da die Neurite bzw. Neurofibrillen sich noch weiter zu schwärzen vermögen. Während in anderen Strukturen, in denen die Vergrößerung der Silberkeime wegen der örtlichen Gegebenheiten nur zögernd vor sich geht, weiterhin das naszierende Silber hauptsächlich in den Intermicellarräumen abgelagert wird, kommt es an anderen, deren Interfibrillarräume bereits ausgefüllt sind, zu größeren Silberablagerungen an der Oberfläche der Fasern. Diese können dadurch beträchtlich verdickt werden. Der Dichroismus geht dabei verloren.

In dieser Hinsicht ist ein Befund Bretschneiders (1950) von Wichtigkeit. Er untersuchte mit dem Elektronenmikroskop Ziliaten und deren von B. M. Klein (1926—1937) beschriebenes „neuroformatives System“. Dieses ist ein System aus feinen „Silberlinien“, welches sich unterhalb der Pellikula ausbreitet. Seine Fasern lassen sich nach Trocknung der Ziliaten durch Behandlung mit Silbernitrat und anschließende Belichtung versilbern. Die „Silberfasern“ haben dann einen Durchmesser von etwa 250 m μ . Die unversilberten „Silberlinien“ zeigten dagegen im Elektronenmikroskop nur einen Durchmesser von etwa 100 m μ . In diesem Falle wurde also der Durchmesser an sich unsichtbarer Fasern auf das Zweieinhalbfache vergrößert und so diese Gebilde in den Bereich des Lichtmikroskopes gebracht.

Bei der Imprägnationsmethode Kleins handelt es sich um ein Verfahren der Vorversilberung, welches ohne nachfolgende „Entwicklung“ arbeitet. Man wird annehmen dürfen, daß es bei der Gros-Schultze-Methode ebenfalls zu einer gleichen, vielleicht auch zu einer noch viel stärkeren Durchmesservergrößerung gerade der feinsten Fasern kommt.

Man muß froh sein, daß man durch diese Eigenschaft der Silberimprägnation Fasergebilde zu Gesicht bekommt, die an sich dem submikroskopischen Bereich angehören. Andererseits müßte man dies aber auch bei der kritischen Auswertung der mikroskopischen Präparate bedenken. Der Meinungsaustausch, ob die zartesten peripheren Ausläufer des vegetativen Nervensystems Netze oder Geflechte bilden, erscheint so in einem neuen Licht. Während Autoren, die mit Silberimprägnationen arbeiten, meist für die Retikulumnatur der feinsten neurofibrillären Ausbreitungen eintreten, halten Autoren, die mit Methylenblau die Nerven supravital darstellen, an deren Geflechtnatur fest.

Diskussion

Der Streit, ob Neurofibrillen Artefakte sind oder nicht, ist für unsere Untersuchung ohne Belang. Am ehesten dürften sie unter den von Zeiger (1949) geprägten Begriff der „reversiblen Struktur“ fallen und demgemäß wohl Produkte der Mikrotechnik, aber keine Kunstprodukte sein.

Die experimentellen Befunde der vorliegenden Studie wurden dahingehend gedeutet, daß die submikroskopische Struktur von Nerven- bzw. Bindegewebsfasern von wesentlicher Bedeutung für ihre Imprägnation ist. Bei beiden müßte ein ähnlicher submikroskopischer Aufbau vorhanden sein, der nur in der Weite der Intermicellarspalten Unterschiede aufweisen dürfte. Die Farbe der Imprägnation wurde, solange es zu keiner Silberauflagerung auf die Fasern kommt, mit der Weite der submikroskopischen Spalträume in Beziehung gesetzt; diese müßten demnach bei den schwarz imprägnierten Neurofibrillen weit, bei den nur gelb imprägnierten kollagenen Fibrillen sehr eng sein.

Nach der Beschreibung Frey-Wysslings (1948) scheinen alle nativen Faserarten prinzipiell den gleichen strukturellen Aufbau zu besitzen. Die mikroskopisch sichtbaren Fibrillen setzen sich aus einer Anzahl unsichtbarer submikroskopischer Mikrofibrillen zusammen, die voneinander durch weitere oder engere interfibrilläre Spalträume getrennt werden. Die Spalträume kommunizieren miteinander; in ihnen können größere Moleküle, wie Farben oder Partikel aus reduziertem Silber abgelagert werden. Die Mikrofibrillen selbst werden von Micellarsträngen gebildet, die zwischen sich nur ganz feine Intermicellarspalten lassen. Zu diesen haben meist nur Quellungsmedien, wie Wasser und Salzlösungen, Zutritt. Das submikroskopische Spaltraumsystem nativer Fasern ist also heterokapillar; es trennt die Mikrofibrillen und in diesen die einzelnen Micellarstränge voneinander.

Die Neurofibrillen und kollagenen Fibrillen ordnen sich zwanglos diesem Schema ein. Unterschiedlich dürften, von den verschiedenen Faserperioden abgesehen, nur die Durchmesser der Mikrofibrillen und die Weite der Spalträume zwischen ihnen sein.

Zuletzt hat Baud (1950) mit Osmiumtetroxyd fixierte Neurofibrillen aus dem N. ischiadicus der weißen Ratte mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Er fand parallel zueinander gelagerte, homogene Mikrofibrillen mit 200–300 Å Durchmesser, welche durch ebenfalls 200–300 Å breite Interfibrillarräume getrennt sind. De Robertis (1948) beschreibt dagegen die Mikrofibrillen als „Neurotubuli“. Ihr Durchmesser schwankt stark je nach der Art des verwendeten Materials zwischen 200 und 400 Å. Im menschlichen Sympathicus sollen die „Neurotubuli“ besonders breit sein, ca. 600 Å im Mittel. Mit der Dicke der „Neurotubuli“ scheint die Weite der Spalten zwischen ihnen verkehrt proportional im Verhältnis zu stehen. Die Intermicellarräume in den Neurofibrillen des menschlichen Sympathicus sollen daher besonders eng sein, was gut zu ihrer schweren Darstellbarkeit mit reduziertem Silber paßt. Die „Neurotubuli“ sind sehr labile Gebilde. Sie sind in überlebenden, aber auch in kurz nach dem Tode mit Formol fixierten Neurofibrillen elektronenmikroskopisch darstellbar.

Die kollagenen Fibrillen zeigen dagegen nach einer Untersuchung von J. Groß und F. O. Schmitt (1948) eine Breite von 700–1400 Å. Sie scheinen aus 3 bis 10 Mikrofibrillen zusammengesetzt zu sein; diese lassen nur so enge Spalträume zwischen sich, daß der Aufbau aus Mikrofibrillen im Elektronenmikroskop gerade noch angedeutet ist.

Die Ergebnisse elektronen-optischer Untersuchungen stimmen also gut

mit den im vorstehenden auf Grund der Imprägnationsbefunde postulierten Strukturverhältnissen der Faserarten überein.

Als Fixierungsmittel für die Silberimprägnation wird hauptsächlich Formaldehyd verwendet. Dieses wirkt einerseits durch Vernetzung zwischen benachbarten Peptidketten, andererseits durch Methylenierung. Es erzeugt im mikroskopischen Bereich recht homogene Gelatinierungen und vermag auch im elektronen-optischen Gebiet die submikroskopischen Faserstrukturen weitgehend aufrechtzuerhalten. Außerdem wirkt es oft quellend (Jakobj 1923, K. H. Meyer 1929, v. Tellyesnyczky 1926, Zeiger 1949). Formol vermag also den zur Silberimprägnation scheinbar nötigen submikroskopischen Aufbau von Faserproteinen, besonders auch die Interfibrillarräume, in großem Ausmaß aufrechtzuerhalten. Durch die Methylenierung der Aminogruppen kommt es zu einer Verschiebung der isoelektrischen Punkte nach der sauren Seite, wodurch das Haftvermögen der Silberionen an Neurofibrillen besser wird.

Formaldehyd wirkt auf Lipide stabilisierend, doch läßt es sie auch nicht ganz unverändert. Nach Mladenovic und Lieb (1929) können mit Alkohol und Äther aus formolfixierten Organen nur viel weniger Lipide extrahiert werden als aus frischen. Doch konnte Weil (1929) feststellen, daß der Formaldehyd immerhin die Phosphatide hydrolysiert.

Der gelegentlich zur Fixierung benutzte absolute Alkohol führt durch Entquellung und Schrumpfung zu einem Zusammenbruch des Molekulargerüsts nativer Eiweiße und damit zur Koagulation verschieden großer Protoplasmateile. Er vermag aber auch Lipide und Fette zu lösen, führt so zu einer tiefgreifenden Desintegration der Lipoidfassaden und vermag derart Diffusionswege zu öffnen (Zeiger 1949). Um der hochgradigen Schrumpfung zu begegnen, werden dem Alkohol meist OH-Ionen zugesetzt, die einen gewissen Hydratationszustand aufrechterhalten dürften. Günstig wirken beim Alkohol seine lipoidlösenden Eigenschaften. Nach A. Weber (1947) vermögen die Lipide eine gute Imprägnation zu verhindern; abgesehen von ihren reduzierenden Eigenschaften vielleicht besonders dadurch, daß sie durch die übliche Formolfixierung zum Teil von den sie tragenden Faserproteinen abgespalten werden, in den Interfibrillarräumen liegen bleiben und dann diese verlegen. Weber verbindet demnach die Formalinfixierung mit einer vollständigen Lipoidlösung mittels Dioxan, Isopropylalkohol, Ameisensäure, Kobaltnitrat und Chloralhydrat. Man kann einer so rigorosen Entfernung aller Lipide aus verschiedenen Gründen eventuell skeptisch gegenüberstehen. Die Entfernung der Lipide begünstigt aber sicher den Ausfall der Silberimprägnation. Nach einer mündlichen Mitteilung Boerner-Patzelts vermag saures Formol wesentlich mehr Lipide aus den Geweben zu befreien als neutrales. Es dürfte sich also im Sinne eines schonenden Vorgehens empfehlen, saures Formol zu benützen oder, besser, noch dieses etwas mit Ameisensäure anzusäuern.

Um eine vollständige Imprägnation zu erzielen, ist es nötig, die Art und Weite der Interfibrillarspalten in den Neurofibrillen in optimaler Weise einzustellen. Diese müssen gerade so weit sein, daß die im Vorbad gebildeten Silberkeime durch Diffusionsströme nicht aus ihnen herausgerissen wer-

den können. Die Spaltraumsysteme in Bindegewebsfibrillen sollen dagegen möglichst eng (oder möglichst weit) sein, um eine nur minimale Imprägnation zuzulassen. Die Formaldehydfixierung scheint diese Bedingungen bis zu einem gewissen Grad zu erfüllen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Größenverhältnisse im submikroskopischen Aufbau der Neurofibrillen je nach Tier- und Nervenart weitgehenden Schwankungen unterliegen. Die Fixierungsstabilität nach Formolfixierung ist gering, es ist daher möglich, durch vorsichtige quellende oder entquellende Maßnahmen die Intermicellarräume auf eine günstige Größe zu bringen. Diese sollte aber auch nach Möglichkeit während aller Imprägnierungsprozeduren beibehalten werden. Im Silbernitrat schrumpfen die Gewebe stark. Um dies zu verhindern, setzt Weber dem Vorbad eine geringe Menge Pyridin zu. Bei der Verwendung dieser organischen Base ist besondere Vorsicht geboten. Die günstige Wirkung kann leicht durch ein Zuviel in das Gegenteil verkehrt werden. Es scheinen kollagene Fasern in größerem Ausmaß der Quellung zugänglich zu sein als Neurofibrillen. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß im nativen Zustand bei den kollagenen Fibrillen nicht nur intermicellare, sondern auch intramicellare Quellung möglich ist.

Die Befunde der vorliegenden Studie dürften es gestatten, die Art der Spezifität von Silbermethoden zu beurteilen. Ob eine Struktur schwarz oder braun oder gelb dargestellt wird, scheint danach weniger von rein chemischen Beziehungen als vielmehr von ihrem submikroskopischen Aufbau abhängig zu sein. Es werden eben nicht so sehr Neurofibrillen, argyrophile oder kollagene Fasern wegen ihrer spezifisch chemischen Eigenschaften dargestellt, sondern allgemein Elemente mit Faserstruktur. Wenn die Art und Größe der Intermicellarräume in einem Faserprotein optimal ist, so wird die Struktur schwarz und distinkt imprägniert. Ist dies nicht der Fall, bleibt die Struktur ungefärbt oder zeigt nur gelbe, braune oder graue Töne.

Zusammenfassung

Auf Grund der Gros-Schultzeschen Modifikation der Bielschowsky-Silberimprägnationsmethode zur Darstellung von Neurofibrillen wurden physikalische und chemische Faktoren untersucht, welche die Versilberung zu fördern oder zu hemmen vermögen.

Wenn man entsprechend in Formol fixierte und gewässerte Gefrierschnitte in ammoniakalischer Silberlösung unter dem Deckglas einschließt, dann bräunen bzw. schwärzen sich die Strukturen in verschiedenem Ausmaß. Die durch diese Behandlung den einzelnen Gewebeelementen verliehene Farbe scheint weder von der Reduktionskraft der einzelnen Strukturen noch von ihrer Formolabgabe und auch nicht von der Lage ihres isoelektrischen Punktes wesentlich beeinflusst zu werden. Ob eine Struktur schwarz oder gelb imprägniert wird, dürfte dagegen eher von ihrer Dichte bzw. von der Weite ihrer Intermicellarspalten abhängen.

Die Vorgänge bei der Imprägnation nach Gros-Schultze wurden wie folgt gedeutet:

Im Vorbad in Silbernitrat kommt es zur Keimbildung in verschiedenem

Ausmaß in den einzelnen Geweben. Die Verteilung der Silberkeime wurde nachgewiesen. Sie entstehen zunächst durch elektrostatische Adsorption von Ag-Ionen. Diese gehen dann mit den Gewebsproteinen chemische Verbindungen ein, die durch die Reduktionskraft des Gewebes oder, wahrscheinlich noch in stärkerem Ausmaß, durch frei werdendes Formol teilweise reduziert werden. Die Silberkeime vergrößern sich dann noch durch wechselnde Anlagerung von Silberhydroxyd und kolloidalem metallischem Silber bis zu einer gewissen Größe.

Bei der Reduktion in Formol werden die als „Keime“ bezeichneten Silbersalzkomplexe noch weiter reduziert und gleichzeitig durch Anlagerung weiterer Silberionen vergrößert. Dabei scheinen die in den Hydratationshüllen der Strukturen festgehaltenen Ag-Ionen eine besondere Rolle zu spielen.

Bei der „Entwicklung“ der Silberkeime in ammoniakalischer Silberlösung werden diese durch feinverteiltes naszierendes Silber bis auf ihre endgültige Größe gebracht und ergeben so die wechselnden Imprägnationsfarben der einzelnen Strukturen.

Für den Ausfall der Silberimprägnation scheint eine entsprechende submikroskopische Struktur der Substrate von wesentlicher Bedeutung zu sein. Sind die Intermicellarspalten zu weit, so können die entstandenen Silberkeime durch Diffusionsströme wieder ausgewaschen werden; sind die Interfibrillarräume zu eng oder durch Gewebsspaltprodukte verlegt, so wird die Imprägnation verzögert.

Eine optimale Größeneinstellung der Intermicellarspalten kann durch Lipoidlösung und durch vorsichtige quellende und entquellende Maßnahmen erzielt und soll nach Möglichkeit während aller Imprägnationsprozeduren aufrechterhalten werden.

Die Spezifität der Silberimprägnationen wurde dahingehend definiert, daß nicht Neurofibrillen oder Bindegewebsfasern wegen ihrer spezifisch chemischen Eigenschaften verschieden dargestellt werden, sondern weil sie Faserproteine mit ungleich weiten und verschieden zugängigen Intermicellarraumsystemen sind.

Literatur

- Alsterberg, G., 1948: Mikroskopie 5, 156.
 Baud, Ch.-A., 1947/48: Acta anatomica 4, 44.
 — 1950: Acta anatomica 10, 461.
 Bejdl, W., 1950: Mikroskopie 5, 281.
 Bretschneider, L. H., 1950: Mikroskopie 5, 237.
 Coronini, C., 1949: Mikroskopie 4, 84.
 Feigl, F., 1947: Qualitative analysis by spot tests. 3rd ed., New York and Amsterdam.
 Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York and Amsterdam.
 Gross, J., and Schmitt, F. O., 1948: Journal of exper. Medicine 88, 555. Zit. nach: Excerpta medica, Sect. I., Vol. 4, 186, 1950.
 Gutstein, M., 1929: Z. wiss. Mikr. 46, 357.
 — 1952: Z. wiss. Mikr. 49, 11.
 Heringa, G. C., 1955: Z. mikr.-anat. Forsch. 54, 459.

- Holmes, W., 1945: Anat. Rec. 86, 157. Zit. nach: Palmgren (1948).
Jacobj, W., 1923: Archiv exper. Path. 98, 55.
Jaloway, B., 1938: Z. Zellforsch. 27, 667.
— und Chrzanowski, Br., 1939: Z. wiss. Mikr. 56, 334.
Keller, R., 1925: Die Elektrizität in der Zelle, 2. Aufl., Mährisch-Ostau.
Klein, B. M., 1937: Archiv Protok. 88. Zit. nach: Bretschneider (1950).
— und Missriegler, A., 1935: Z. wiss. Mikr. 52, 121.
Liesegang, R. E., 1900: Camera obscura 1, 841. Zit. nach: Zeiger (1938).
— 1911: Kolloid-chem. Beihefte 3, 1.
— 1935: Z. wiss. Mikr. 52, 307.
Lüppo-Cramer, 1910: Kolloid-Z. 7, 99. Zit. nach: Zeiger (1938).
Meyer, K. M., 1929: Biochem. Zeitschr. 208, 1.
Mladenovic, M., und Lieb, H., 1929: Z. physiol. Chem. 181, 22.
Möllendorff, v. W., 1932: Z. Zellforsch. 15, 131.
Okamoto, K., Utamura, M., und Akagi, T., 1939: Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kioto 22, 361. Zit. nach: D. Glick, Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York and London (1949).
Okino, K., 1934: Fol. anat. jap. 12, 373.
Palmgren, A., 1948: Acta zoologica 29, 378.
Pischinger, A., 1926: Z. Zellforsch. 5, 169.
— 1927: Z. Zellforsch. 5, 347.
— 1943: Z. mikr.-anat. Forsch. 58, 46.
Robertis, E. D. P. de, 1948, in: E. D. P. de Robertis, W. W. Nowinski und F. A. Saez, General Cytology, Philadelphia.
Seki, M., 1940: Z. Zellforsch. 30, 529 und 548.
Silver, M., 1942: Anat. Rec. 82, 507. Zit. nach: Palmgren (1948).
Tellyesnick, K. v., 1926: Fixation, in: Enzyklop. d. mikroskop. Technik, 3. Aufl. 2, 750. Berlin und Wien.
Unna, P. G., 1911: Archiv mikr. Anat. 78, 1.
Weber, A., 1947: Bulletin d'histologie appl. 24, 49.
Weil, A., 1929: Journal Biol. Chem. 83, 601.
Wieberg, E., 1943: Anorganische Chemie, 23. Aufl. des Lehrbuches der Chemie von A. F. Holleman, Berlin.
Zeiger, K., 1936 a: Z. Zellforsch. 23, 431.
— 1936 b: Z. Zellforsch. 24, 11.
— 1938: Physiko-chemische Grundlagen der histologischen Methodik, Dresden und Leipzig.
— 1949: Z. Zellforsch. 34, 230.

Die Leptonik erklärt den duktilen Bau der Lianen-Sprosse von *Clematis Vitalba* L.

Von

H. Ziegenspeck, Augsburg

Mit 16 Textabbildungen auf 2 Tafeln

(Eingelangt am 15. Februar 1951)

Einleitung: Die Wuchsart von *Clematis Vitalba* L., einer der wenigen mitteleuropäischen Lianen

Schlägt man eine der gängigen Biologien der Pflanzen wie Kerner (1888), Neger (1913) oder Migula (1926) auf, so findet man eine ziemlich genaue Behandlung der Lebensgeschichte und Wuchsart der Waldrebe. Wie bei ihren Verwandten (*Cl. recta* L.) auch im späteren Leben, ist bei *Clematis Vitalba* L. in der Jugend die Pflanze aufrecht. Da dieser Stengel zunächst in derselben Art wie bei Windepflanzen mit der raschwüchsigen Spitze kreist, so hält Darwin (1899) dafür, daß die Blattkletterer im allgemeinen und *Clematis Vitalba* im besonderen von Windepflanzen abstammen. Beim Berühren mit Stützen umschlingen sie diese unvollkommen.

Sehr bald setzen sich die Blattstiele als Ranken an die Stelle des Sprosses. Kerner (1888) bildet das für die verwandte *Clematis alpina* L. ab. Die Ranken halten den Sommer über beblättert den Sproß an der Stütze fest. Die Blätter fallen im Herbst ab, jedoch die Rankenstiele bleiben erhalten, wie schon Mohl (1827) wußte, und dauern zwei Jahre aus, im Winter zwar vertrocknend, aber noch nicht verfallend. So an eine Pflanze angeheftet, streben die Sprosse immer weiter nach oben bis zu 10 m. Diese Höhe könnte der bleistiftdicke, aber zähe Stamm ohnedem nicht erreichen.

Durch starke Verzweigung und Ineinanderwinden bilden sich dicke Überzüge und Gewirre, die z. B. in den oft sehr ursprünglichen Auwäldern der süddeutschen Flüsse (Lech) wirkliche Dickichte darstellen können. In etwas durch die Kultur „gezähmter“ Form bildet (Migula) einen solchen Vorhang der Waldrebe ab.

Das Aufgeben des Windens ist nach Darwin von großem Vorteil, weil die Blattranken (*cirrho petiolares*) einerseits fester an den oberen Teilen haften und sich immer erneuern. Andererseits kann der Stengel besser organisiert sein und mit seiner ganzen Länge auch an sehr dicken Bäumen aufsteigen, ohne durch das Dickenwachstum beeinflusst zu werden. Nahe Verwandte bilden richtige Ranken aus, wie unser Autor ausführt (*Naravelia*).

Elastizität der Ranken und der Sprosse

Nimmt man eine Ranke, mit jeder Hand an den Enden anfassend, und zieht man, so bemerkt man deutlich auch an abgestorbenen Stücken die gummiartige Ziehbarkeit, ohne daß die Ranke zerreißt. Die Ranke ist hochgradig ausziehbar und elastisch. (Ihre Anatomie und Leptonik ist zwar von uns untersucht worden, soll aus Raummangel nicht behandelt werden.) Ebenso elastisch sind die alten und jungen Sprosse. Wir konnten das selbst an ziemlich dicken Stücken mit fünf und mehr Jahresringen feststellen. Das kannte bereits Sonntag (1909). Auf ihn geht die Kenntnis der Beziehung zwischen Micellierung (Verlauf der Micelle) und Elastizität und Duktilität zurück. Die Waldrebe ist geradezu ein Musterbeispiel für Ziehbarkeit und Elastizität.

Kein geringerer als Steinbrinck (1927) hat diese Gedankengänge übernommen und uns (1938) zur Aufstellung des Gegenmicelldehnungssatzes veranlaßt. Durch die Untersuchungen von Mez und nicht zuletzt durch Rasdorsky (1925—1930, 1937) kommt man zur Federfestigkeit der Stämme. Die Übertragung auf die Einzelzelle ist von mir selber (1943) eingehend vertreten worden. Vgl. auch Tobler (1939) und Walter (1946). Meines Wissens findet sich keine eingehende Behandlung der Anatomie und der Leptonik der Einzelelemente, die sicher für eine ganze Reihe von Schling- und Kletterpflanzen von programmatischer Bedeutung ist. Sie soll daher im nachfolgenden im Lichte der Elektronenmikroskopie von Frey-Wyssling und Mühlethaler (1948, 1949, 1950), Kratky (1951), Wergin (1942, 1950), Wyckoff (1944, 1948) vorgenommen werden. Die verfeinerten lichtmikroskopischen Beobachtungsmethoden lassen uns eine Reihe von Beobachtungen mit den Mitteln erzielen, die auch den nicht mit Übermikroskopen Gesegneten zugänglich sind. Um die Abhandlung nicht zu sehr anschwellen zu lassen, muß ich auf die Schilderung der Methodik verzichten, die unter anderem in verkürzter Form gegeben ist (Ziegenspeck 1951). Der Vorteil der Verwendung von Polarisationsmikroskop, Dichroismus und Metachroismus, Phasenkontrast und Dunkelfeld mit Azimutblende liegt zudem in der topographischen Behandlungsmöglichkeit des Gewebes oder seiner Einzelelemente in Form von Mazerationsprodukten durch Schulzesches Gemisch. Wir wollen nun im nachfolgenden, von der gewöhnlichen Anatomie ausgehend, zu der Behandlung mit den Methoden der Leptonik fortschreiten.

Physiologische Anatomie des Stengels im Winterzustande

Querschnitt

Die ganzen Teile innerhalb des Kambiums zeigen, mit dem Lux UV von Reichert untersucht, eine sehr kräftige, primäre, himmelblaue bis grünliche Fluoreszenz. Diese eignet, wie bereits Metzner (1930) und ich (1951) und auch meine Schüler Kühnemund (1952) und Eichler (1954) ermittelten, allen verholzten Substanzen und fällt meist mit der Phloroglucinreaktion zusammen. Von der Verholzung sind demnach weder die Markstrahlen noch das Holzparenchym noch der größte Anteil des Markes frei. Die Fluoreszenz ist dabei ziemlich gleichmäßig auf alle Lamellen der stark verdickten Wände

ausgebreitet, höchstens an ganz feinen Schnitten beobachtet man eine besondere Verstärkung in den sehr feinen Interzellulärsubstanzen. Zum genauen Nachweis dieser Dinge muß man die Apperturblende der starken Objektive anwenden, wie das von Reichert empfohlen wird (1944). Wir verwenden zu diesem Zwecke eine Objektivblende auch für starke Trockensysteme, welche man bei Dunkelfeldbeobachtung zum Vermeiden der Überstrahlung empfiehlt. Fluoreszenz in grünlicher Farbe besitzt der Kork der übereinander gelagerten Borkenteile. Die Bastelemente ließen die Holzreaktion vermissen.

Die weitere Untersuchung benützte vornehmlich die metachromatische und dichroitische Färbung mit Benzazurin (Czaja 1930, Ziegenspeck 1938, 1940, 1941). Als Einbettungsmittel verwandten wir zumal das Euparal. Daneben führten wir Behandlung mit dem ebenfalls dichroitische Reaktion erzeugenden Chlorzinkjod durch (Frey-Wyssling 1928, Ziegenspeck, l. c.). Die Untersuchung mit dem Phasenkontrast und Dunkelfeld erfolgt am geeignetsten in Phenolglyzerin oder Phenolmilchsäure (ein Teil konzentriertes Glycerin oder Milchsäure auf neun Teile Phenolum liquefactum). Dieses Medium besitzt ein gewisses Bindevermögen für Gewebewasser, ohne Trübung oder Abscheidungen zu erzeugen. Die Reflektion der Oberfläche der Zellwände usw. wird durch die hohe Lichtbrechung ausgeschaltet. Auch für viele Untersuchungen von Gewebe mit dem Polarisationsmikroskop bietet dieses Verfahren Vorteile vor der Aufhellung in Chloralhydratglyzerin, weil es auf Zellulose und ihre Abkömmlinge mehr physikalisch einwirkt. Zum Vermeiden von Auskristallisation gibt man dem üblichen Chloralhydrat etwa 10% Glycerin zu. Daß zum Klären der Bilder vielfach chemisches Aufhellen in Eau de Javelle vorteilhaft ist, setzen wir als bekannt und üblich voraus. Bei den Untersuchungen auf Dichte mit Metachroismus muß man dies unterlassen oder nur sehr kurz einwirken lassen, weil dadurch viele „Füllmittel“ der Wandungen zerstört werden. Über die Einzelheiten der Präparation sei auf die Literatur verwiesen (Ziegenspeck 1938, 1951).

Mark

Nur ein ganz geringer Teil des Markes im Inneren des Stengels ist zerdrückt und zerpreßt, er nimmt die blaue Färbung wenig dichter Wandungen mit Benzazurin und Chlorzinkjod an. Dieser unverholzte Markkern ist von zwei bis drei dichteren, also rotviolett bis rot gefärbten Zellen eingehüllt, die nur schwach verdickte Wandungen haben. Die Hauptmasse (10 bis 15 Zellagen) ist stark verdickt, lamelliert und verholzt.

Interzellulärsubstanz ist auffallend wenig vorhanden und die Zwickel sind nicht aufgefüllt, sondern führen Luft. Die einzelnen Sekundärlamellen weichen durch verschiedene Brechung ab. Ihre Doppelbrechung ist im Sinne einer perizellulären Micellierung, wenn man die Anschnitte der Wände anschaut. Sehr häufig lösen sich aus der Schnittfläche einzelne Fila heraus. Wir bezeichnen mit diesem Namen die Bündel von Mikrofibrillen, welche ins Bereich der Sichtbarkeit kommen (Ziegenspeck 1951). Die Fila liegen im Sinne des Zellumfanges und ihre Doppelbrechung streicht gleichfalls so. Die Flächenwände des Querschnittes sind dermaßen reichlich mit Tüpfeln aus-

gestattet, daß durch deren zirkuläre Micellierung ein buntscheckiges Bild mit dem Polarisationsmikroskop und Gipsplättchen Rot I-Ordnung aufkommt und man keine andere Micellierung als diese netzige aufweisen kann. Das bedeutet eine allseitige Festigung der Querschnittflächenwände der Zellen.

Alle Markzellen führen Stärke. Wir sind versucht, in diesem Vorkommen eine Sparstärke für Gewebeumwandlungen beim Sprengen des von innen den Holzkörper bindenden Markes zu sehen (Ziegenspeck 1924). Gegen die Holzprimanen verdichtet sich das Gewebe zu einer kleinzelligen Markscheide.

Xylemteile

Die Holzprimanen stehen dicht und sind mit anderen verholzten Zellen vereinigt. Sie nehmen rasch an Größe zu. Zwischen die Vorwölbungen der Primanen drängen sich die Markstrahlen vor, zunächst noch von kleinen dichten Holzzellen gebildet. Sie sind ziemlich breit: 18 bis 20 Zellen. Ihre verdickten und verholzten Zellen beginnen erst dann mit der radialen Streckung, wenn die ersten, weiten, drei bis vier Riesengefäße im Holzteil erscheinen. Ihr Lumen ist von der Größenordnung, die den Lianen und sonstigen Organen mit sehr großer Leitfähigkeit für Wasser auf engem Querschnitte zukommt. Bekanntlich ist der Widerstand gegen den Durchgang nach dem Peiseuilleschen Gesetz für Kapillaren umgekehrt proportional dem Quadrate der Querschnittfläche. Die anderen Größen, die diesem Gesetze zugehören, können wir zunächst außer Beachtung lassen (Fuchs-Ziegenspeck 1925, Ziegenspeck 1936, Huber 1928). Der Durchmesser der großen Tracheen schwankt zwischen 100 und 224 μ , selten sind es nur 80 bis 100 μ . Setzen wir für die Rechnung 160 μ als Durchschnitt an, so ist die Größe eher zu klein als zu groß. Der ganze Querschnitt eines fünfjährigen Sprosses führt etwa 300 Stück. Die kleinen Tracheen, die man deutlich als solche auf dem Querschnitte erkennen kann, sind etwa 3600 an der Zahl. Ihr Durchmesser ist im Durchschnitt etwa 29 μ (22 bis 36 μ). Durch Rechnung ist die Leitfläche etwa ein Drittel der großen Tracheen. Wenn man nun noch bedenkt, daß auch die Länge der Tracheenröhren ohne Querwände ebenfalls in Rechnung gesetzt werden muß und diese bei den weiten etwa 2 m¹ gegen höchstens 10 cm bei den kleinen hat, so wird man kaum fehl schätzen in der Annahme, daß bei guter Versorgung durch die Wurzeln die Leitung fast ausschließlich durch die weiten Tracheen bewerkstelligt wird und daß die engen nur einen geringen Anteil, kaum ein Zehntel, der Wirkung ausmachen.

Die Dicke der Wand der Tracheen ist etwa 7 μ bei den weiten und 3 bis 4 μ bei den engen Gefäßen. Wir sehen, daß damit die Wand bei den engen Gefäßen im Verhältnis besser gesichert ist als bei den weiten Gefäßen. Wir verstehen daher das Einfassen der überweiten Riesengefäße mit stark verdickten Elementen (Libriform und Ersatzfasern). Das Einfassen erfolgt zumeist in einem Bogen auf der Außenseite. Vielfach nähern

¹ Bei Lianen findet man bis 5 m lange Riesengefäße (Walter 1946, Lehrbuch 1947).

sich die Tracheen den Anhäufungen von derbwandigen Elementen an den Markstrahlen.

Zumal gegen Jahresende und vornehmlich bei den späteren Jahresringen erscheinen nach den überweiten Tracheen noch eine größere Anzahl der in obigen Rechnungen berücksichtigten engen Tracheen, Tracheiden und Übergangsbildungen zu Holzparenchym und Ersatzfasern. Die drei letzteren Bildungen sind aber auf dem Querschnitte schlecht zu erkennen und abzuschätzen. Da diese Zellen verhältnismäßig kurz sind, so kommen sie für die Leitung bei guter Wurzelversorgung kaum in Frage.

Kambium und sekundäre Rinde

Eine Eigenart des Querschnittes sind die vorspringenden Rippen am Ende jeden Jahres bei den Markstrahlen. Sie bestehen aus engwandigen, stark verdickten Holzelementen, also Libriform und Ersatzfasern. Seitlich von ihnen mündet oft ein Markstrahl aus. Er ist aber nicht an dieser Stelle verholzt, sondern besteht aus unverholzten und kaum verdickten Zellen. Ein solcher Keil dringt von außen in das Holz auf kurze Strecken ein. Bei den dichroitischen Färbungen und Reaktionen heben sich diese blau bis violett gefärbten Anteile deutlich von dem rot, bzw. gelb gefärbten Holzkörper ab, je nachdem man Benzazurin oder Chlorzinkjod angewandt hat. Diese mehr oder weniger kambialen, zum mindesten noch radial streckbaren Markstrahlenden sind in eine feste Hülle eingelagert.

Durch die vorstehende Rippe wird eine konkave Einbuchtung erzeugt, in die das kambiale Gewebe und der tätige sekundäre Bast eingebettet ist. An seiner Außenfläche trägt er eine Lage Hartbastfasern aus zwei bis drei Zellen. Sie ist dicht geschlossen und biegt sich nach innen auf die Rippe zu. So sind die empfindlichen Kambien und das lebende Phloëm in eine flache Hülle eingelegt, die auf dem Querschnitte bikonvex erscheint.

Das kambiale Gewebe ist ziemlich umfangreich. Es ist in deutliche radiale Reihen von 15 bis 20 Zellen angeordnet. Die Radialwände sind auffallend derber als die feinen tangentialen. Die innerste, sich durch die blaue Färbung vom Holz abhebende Schicht hat hin und wieder eine dünne rötliche Sekundärlamelle. Die tangentialen Reihen der meist viereckigen Zellen sind zunächst nach innen konvex vorgebogen. Gegen das Phloëm zu gleicht sich die tangentielle Reihe zu einer Lage im Sinne des Stammumfanges aus.

Es kommt nunmehr das Phloëm. Die Grenze ist durch eine Zelllage gebildet, die vielleicht etwas Korkmembranen angelagert hat, auf jeden Fall ein Phellogen bilden wird. Die etwa 18 bis 20 äußeren Zellen, das noch tätige Phloëm, hat etwas mehr abgerundete Zellen. Auffallend dabei ist, daß nur geringe oder keine Größenunterschiede vorliegen. Gelegentlich erkennt man eine Siebplatte. Auffallend große Siebröhren fehlen. Ebenso fehlt eine Gliederung in Geleitzellen und Bastparenchym, sofern sich diese an aufgehellten Schnitten erkennen läßt. Die *Ranunculaceae* neigen häufig zum Fehlen eines eigentlichen Bastparenchyms.

An der Außengrenze liegt ein Bogen von Hartbastelementen mit starker Verdickung der Wände. Da das kambiale Gewebe am Holze durch den

bogenigen Verlauf nach dem Holze zu breiter ist als die Grenzzone, so ist der Weichbast beim Verwachsen dieser Teile nach außen kürzer.

Wo die Markstrahlen im Baste verlaufen, besitzen sie etwas radial gestreckte Zellen. Die Querschnittsflächenwände tragen ausgesprochene, große Tüpfel mit Spangenenfilamenten, die wir für das sonstige Bastgewebe weiter unten beschreiben.

Borkenbildung

Regelmäßig bildet sich an der Grenze gegen das ruhende Kambialgewebe in jedem Jahre eine Phellogenschicht, die nach innen einige (drei bis vier) Phellodermzellen erzeugt, die wieder in ihren etwas tangential gestreckten Wänden die Tüpfel mit Filarspangen haben. Nach außen gliedert das Korkkambium etwa fünf Peridermzellen ab, die sich mit dem metachromatischen Farbstoff gelblich färben. Das Phloëmgewebe wird zu Keratenchym zerpreßt, nur vereinzelte Bastparenchymzellen strecken sich tangential und haben wieder die Tüpfel mit den Spangenenfilamenten. Dann schließt sich die vorjährige Hartbastschicht an. Es kommt zu einer eigenartigen Farbfolge mit Benzazurin: blau (Phelloderm), gelb Periderm, rot Keratenchym und Bast. Der Zerfall der Borke und die Sprengung an den Stellen über den Markstrahlen erzeugt die eigenartige Abschürfung der langen Borkenbänder.

Aus dem Querschnitte erkennen wir den eigenartigen Schutz der Phloem- und Kambialgewebe sowie des eingesenkten Markstrahlkambiums. Jedoch eine Erklärung für die Elastizität können wir nicht ableiten.

Um weiterzukommen, müssen wir die Längsschnitte studieren.

Längsschnitte des Kambiums und Phloëms

Die Betrachtung derselben mit Benzazurin und Chlorzinkjod, weniger mit Phasenkontrast und Dunkelfeld, läßt uns sehr tiefe Einblicke in den Wandbau tun. Alle mehr oder weniger gestreut micellaten Membranen erscheinen in dem Mikroskop dunkel, hellblau bis weiß.

Bei schwacher Vergrößerung fällt bereits der unscharfe Dichroismus auf. Man sieht dunkel bzw. heller blau. Das kann einerseits auf gestreute Micelle hinweisen, es ist also dann keine scharfe Plus- und keine scharfe Minusstellung nachzuweisen. Andererseits sind gekreuzte Membranen vorhanden, die sich bei flachen Spiralen der Micelle teilweise aufheben. Mit dem Gipsplättchen Rot I. Ordnung allein beobachten wir eine Additionsfarbe bei Parallelstellung der Querdurchmesser der Zellen zur Achse.

Durch die Betrachtung mit starker Vergrößerung (1/12 Immersion oder, weniger deutlich, mit Objektiv 6 L Leitz) bekommt man tiefe Einblicke in den Membranaufbau. Die derberen Radialwände haben keine umfangreichen Tüpfel. Zwischen hellen, ungefärbten gekreuzten Teilen beobachtet man ein System sich kreuzender, hauchdünner Striche, die stark anfärbbar sind. Durch Drehen über dem Mikroskop findet man drei Stellungen:

a und ä) Bei der Quer- oder Längsstellung des Längsdurchmessers der Zelle erkennt man stärker oder schwächer gefärbt das Muster der beiden Streifungen. Es ist die Additions- und Subtraktionsstellung mit dem Komparator (Gips- oder Glimmerplättchen). Wir haben die Dinge photographisch festgehalten, A mit Benzazurin, A mit Chlorzinkjod.

b) Es kann nur eines der Streifensysteme in Plusstellung, also dunkler Farbe bei schiefer Stellung zur Schwingungsachse des einen Nikols sein. Das andere ist dann mehr oder weniger in Minusstellung und somit unsichtbar bzw. hell geworden. Unverkennbar ist die Wandung aus feinsten Fila in flachspiraliger Anordnung aufgebaut (B). Die flachen Spiralen der Fila werden beim Ziehen elastisch gespannt.

Diese Filarstreifen sind bei genauester Betrachtung ziemlich isoliert (siehe auch Schaeede 1940). Wir stellen fest, daß die Dicke dieser Fila etwa mit der der Mikrofibrillenbündel der Sekundärwände der Elektronenmikroskopie zusammenfällt. Am Rande der Schnitte, wo eine Zelle angeschnitten ist, sieht man die Fila frei münden, es entstehen kammartige Bilder. Auch dieses Mal haben wir die Bilder aufgenommen. Die Beobachtung in Chlorzinkjod läßt eine gewisse Quellung aufkommen (C in Mittelstellung, C' in Plusstellung des Dichroismus). Man kann diese Fila, wie wir sie nennen (Ziegenspeck 1951), auch mit Phasenkontrast, Dunkelfeld mit Azimut und Polarisation kenntlich machen, zumal wenn man vorsichtig mit Kupferoxydammon quillt. Sie sind ein gesondertes Element der Wandung. Solche Wandungen nennen wir eufilat, weil die Fila ohne nennenswerte Streuung in einer Richtung streifen.

Stellt man sich hingegen die Tangentialwände ein, so gewahrt man ein ganz anderes Bild. Es finden sich ziemlich umfangreiche Tüpfel oder Tüpfelfelder. Um diese ist die Wand ohne Filarstruktur zirkular micellat. Die Tüpfel bzw. die „Felder feinsten Tüpfelchen“ sind dadurch aus den Zugspannungen herausgelöst (Ziegenspeck 1940, 1948). Die Wandung zwischen diesen ist ausgeprägt quermicellat, also längsziehbar und von einer gewissen Elastizität.

Beim Betrachten der Tüpfelschließhaut oder der „Felder der feinsten Tüpfelporen“ gewahrt man die schon mehrfach angeführten durchstreichenen Spangenfila. Sie sind deutlich durch Färb- bzw. Reaktionsdichroismus kenntlich und durchziehen in allen Richtungen die Schließhaut. Ohne Nikol erscheinen sie nur schwach als eine Art Netzung. Ich möchte diesen Aufbau als Reteofilierung bezeichnen. Wir bitten, einen Vergleich mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Tüpfel zu vergleichen (Mühlethaler 1950). Sie sind identisch, weil die dortigen Mikrofibrillenbündel dieselbe Dimension wie unsere Spangenfila besitzen. Der Name Filum ist nur handlicher als die dortige Bezeichnung mit einem Sprachmonstrum (Ziegenspeck 1951). Auch diese Spangenfila haben wir mikrophotographiert (D).

Die Querwände der Kambial- und Phloëmelemente, welche in der Querschnittfläche des Schnittes liegen, haben eine völlige eufilate Struktur. Man sieht Siebwände mit sehr feinen Tüpfeln. Die Spangenfila kommen schlechter heraus. Ein Mikrophotogramm ohne Nikol sei als E beigegeben. Das gibt eine Aussteifung der Querwände, die in allen Richtungen gleich nach- oder unnachgiebig ist. Erweitern sich die Siebfelder, so entstehen die weiten Poren der Siebplatten der Siebröhren.

Wir können also an den Schluß dieses Absatzes die Behauptung setzen: Die gekreuzte flachspiralige Eufilierung der Radialwände erzeugt ein elastische Konstruktion derselben. Die durch Spangenfila und zirkuläre Micel-

lierung ausgezeichneten Tüpfelschließhäute sind damit aus der mechanischen Beanspruchung ausgeschaltet. Dagegen sind die tüpfelfreien Tangentialwände infolge ihrer Quermicellierung ziehbar eingerichtet. Der durch die verholzten und verdickten Elemente geschützte Weichbast und die Kambialzone sind von längsziehbarer (duktiler) Bauart.

Bei unseren Betrachtungen gehen wir nun zu den

Längsschnitten durch das Xylem

über. Die Einzelelemente sollen zugleich in den Isolierungen durch die Maceration behandelt werden, da diese nach dem Schulzeschen Verfahren gewonnenen Einzelzellen besonders gut auf die Micellierung und Filierung untersucht werden können. Die metachromatische Färbung mit Benzazurin und die Reaktion mit Chlorzinkjod ergeben allerdings andere, tiefere Färbungen als die unbehandelten oder nur schwach aufgehellten Schnitte.

Die großen Gefäße (Gefäßriesen)

Die ausnehmend derbe Wand ist dicht mit Tüpfeln besetzt. Sie sind im allgemeinen quer ausgezogen und im gleichen Sinne behöft getüpfelt. Ihre Richtung fällt mit der queren Micellierung zusammen. An Anschnitten läßt sich die Filierung an den kammförmigen Enden und dem Hineinstreichen abnorm violett gefärbter Striche in dieselbe rote Wandung erkennen. Während sich sonst die Wandung mit Chlorzinkjod gelb bis braun und mit Benzazurin rot färbt, nehmen die Fila deutliche blaue bzw. blauviolette Farbe an.

Beim Betrachten von Schnitten oder auch von Maceraten in Phenolglyzerin (1:10) unter Aufsetzen einer Polarisatorplatte oder eines Analysators treten die Spalten der Höftüpfel besonders scharf bei paralleler Lage zur Polarisationssebene hervor. Bei senkrechter Lage dagegen verschwimmen diese Anteile, und die Primärwand hebt sich grau gefärbt deutlich mit der elliptischen Schließhaut der Hoftüpfel ab. Kennzeichnenderweise gewahrt man einige senkrecht zum Micellverlaufe streichende Spangenfila in der Sekundärlamelle, welche gewissermaßen die Fibrillen seitlich zusammenhalten, sobald man ganz feine Anschnitte mit dem Phasenkontrast und Nikol ansieht.

Die Fila in der sekundären Wand kann man in mehreren Anschnitten der Lamellen übereinanderliegend gewahren. Die Sekundärlamelle ist somit ausgesprochen quermicellat und querfilat zum Längsverlauf der Trachee, wie man durch Dichroismus und mit dem Gipsplättchen Rot I. Ordnung oder Glimmerplättchen $\frac{1}{4} \lambda$ ebenso deutlich erkennen kann, wie man die Fila in querer Richtung streichen sieht.

Die Verbindungswülste der Einzelglieder besitzen den gleichen quermicellaten und querfilaten Bau. Selbst die Spangenfila sind mit den angegebenen Verfahren auffindbar.

Die Gefäße sind somit einerseits aufs beste gegen seitliches Zusammendrücken gesichert, andererseits doch etwas in der Längsrichtung ausziehbar. Dieser Bau ist der auch sonst bei Gefäßen aufzufindende. Neben den schma-

len Hoftüpfeln bemerkt man, zumal beim Anstoßen an Tracheen kleinerer Gestaltung und Tracheiden, mehr runde Hoftüpfel, wenn dies auch ziemlich selten zur Beobachtung gelangt. Irgendwelche Spiralleisten hingegen vermißt man.

Die großen Gefäße umgibt zumeist eine Lage niederer Holzparenchymzellen. Seine Micellierung erweist sich als querstreichend ganz im Sinne der Gefäße. Sie sind gegen diese stark verdickt und verstärken gewissermaßen den Umfang der Röhren. Ihre Tüpfelschließhäute werden bei schlechterer Wasserversorgung in das schwindende Lumen der Gefäße hineingezogen und helfen die Spannung etwas mildern. Wenn jedoch diese übergroß ansteigt, dann kommt das Tracheenwasser zum Sieden, und Wasserdampf füllt unter Entfaltung eines Unterdruckes das Lumen der weiten Gefäße. Es ist daher an sehr heißen, trockenen Tagen leicht, sowohl Quecksilber als auch Lösungen in diese einsaugen zu lassen, die unfähig sind, die Wandungen zu durchdringen (z. B. Liquor Ferri oxychlorati oder entsprechende grobe Suspensionsfarbstoffe). Hierzu muß man nur unter dem Quecksilber bzw. der Lösung abschneiden. Nach dem Vorbilde von Blum-Ursprung kann man das Quecksilber z. B. mit dem Röntgenschild nachweisen oder die Eisensole in Berlinerblau umwandeln, wie das ja Geflogenheit der alten Physiologen war.

Wie bei der Schilderung der Querschnitte ausgeführt, findet man daneben eine große Zahl von

kleineren Tracheen

Sie sind von normaler Größenordnung und nicht von dem Umfange, wie sie bei Lianen unmittelbar mit dem bloßen Auge gesehen werden. Ihr Bau nähert sich zum Teil dem der Riesengefäße. Daneben trifft man solche mit schief gestellten Trennungseinschnitten der fusionierten Zellen. Ihre Hoftüpfel pflegen kleiner zu sein. Sie können wie bei den Riesengefäßen quer streichen oder aber wie bei den Tracheiden mehr schief verlaufen, wobei sie mit der Wand etwa einen Winkel von bis 10 Grad bilden. Die Regel, daß die Tüpfelenden im Sinne der Micellierung der Tragwand ausgezogen sind, trifft zu. Die fusionierte Röhre kann nun länger oder kürzer sein und sich damit sowohl den Gefäßriesen wie den Tracheiden annähern. Zumal bei den Tracheen mit schiefen Enden und schiefen Hoftüpfeln ist häufig innen eine Auflage von Spiralbändern vorhanden, die auf die Sekundärlamelle gelagert ist und somit nicht mit der Gestaltung der Spiralgefäße verwechselt werden darf. Diese feinen Spiralbänder streichen mit 10 bis 15 Grad etwas steiler als die Tüpfel und Micellierung. Die Bänder sind oft eng aneinander gereiht und kreuzen sich mit denen der anderen Wandseite und der benachbarten Trachee oder Tracheide. Hinsichtlich der Elastizität gelten dieselben Beziehungen wie bei der nachfolgend zu schildernden Gruppe der

Tracheiden

Ihre Anzahl ist sehr groß. Sie sind zum Teil ganz schmal und lang, zum Teil etwas weitlumiger und nähern sich auch hierin den kleinen Gefäßen an. Die Regel, daß nie in einem Hadrom Gefäße allein vorkommen, sondern immer Tracheiden damit gepaart sind, ist hier zutreffend.

Ihre um etwa 10 bis 15 Grad geneigten Spalttüpfel stehen im allgemeinen steiler als bei den Tracheen. Auch die innen aufgelagerten Spiralbänder haben größere Neigung, bis zu 40 Grad. Es handelt sich demnach immer noch um Flachspiralen. Die Micellierung streicht in der Sekundärwand entlang den Spalttüpfeln und in den Bändern zu diesen. Ebenso beobachtet man mit dem Phasenkontrast und Nikol eine Streifung der Wand und auch Spiralbänder, wenn sie parallel zur Polarisationssebene liegen. Bei senkrechter Stellung verschwinden sie mehr oder weniger und die großen Umrisse der Schließhäute der Tüpfel treten grau gefärbt hervor.

Besieht man sich die Schnitte mit Chlorzinkjod, so gewahrt man die Hoftüpfel und Spiralbänder violett von Fila eingesäumt, welche in Plusstellung die Bänder scheinbar verengen und in Minusstellung auf dem Mikrophoto weiter erscheinen lassen. Bilder *F* und *F'* haben das festgehalten.

Mechanisch haben die Tracheiden sicher die Funktion von elastischen Flachspiralen und tragen wesentlich zu der gummiartigen Ziehbarkeit (Duktilität) mit bei. Für die eigentliche Wasserleitung haben sie zunächst weniger zu bedeuten, solange eine gute Versorgung durch die Wurzeln gewährleistet ist.

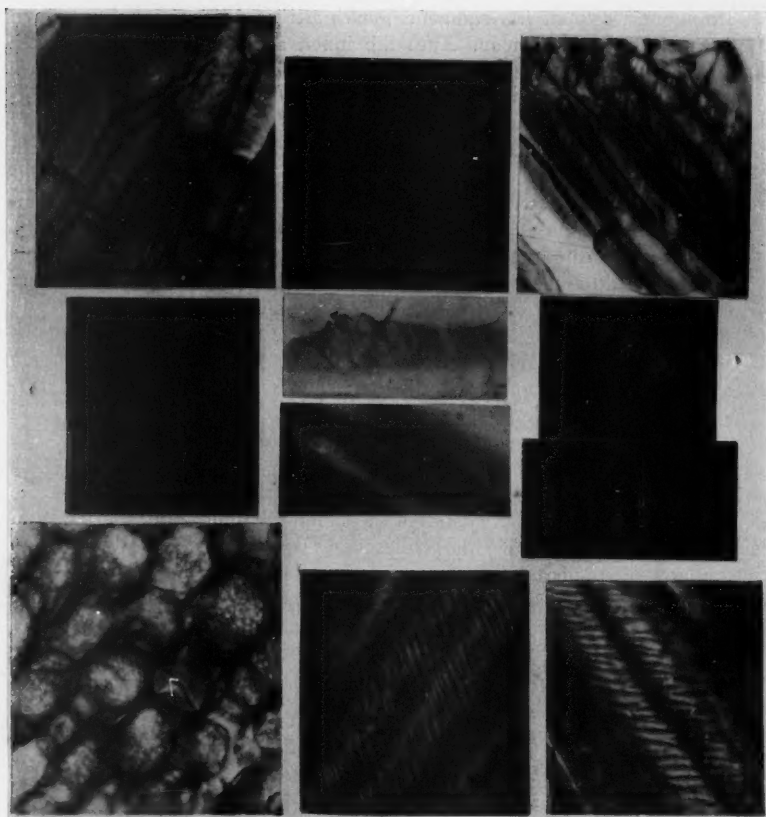
Sobald hingegen diese eingeschränkt ist oder gar aussetzt, dann setzen sie dem Sieden der Füllflüssigkeit durch die große Oberfläche der Einzelzellen und die sehr große Anzahl von Schließhäuten einen Widerstand entgegen. Sie können dann noch mit Füllwasser geladen eine gewisse Leitung vermitteln und auch noch Nachschub ermöglichen, falls die Tracheen oder gar die Riesentracheen durch Füllung mit Wasserdampf bereits ausgeschaltet sind. Ob nicht daneben im Sinne von Porsch die Verholzung der Wände mit der von ihm geforderten Adhäsion eine Rolle spielt, möge dahingestellt sein.

Durch allerhand Übergänge sind die Tracheiden verbunden mit den

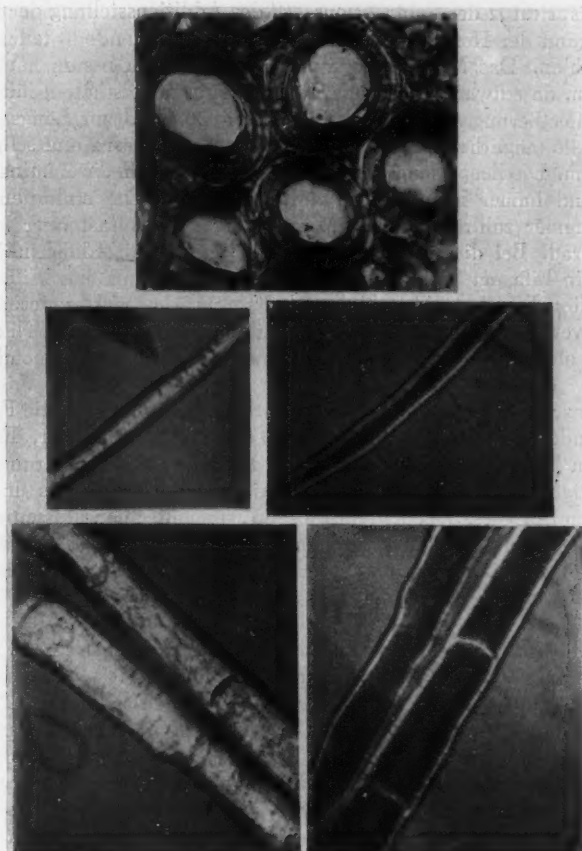
Holzfasern

Man findet zumal im Maceraten häufig feine Holzfasern mit stark ausgebildeten Spiralbändern flacher Richtung. Die Hoftüpfel werden spärlich oder gehen verloren. Dagegen begegnet man oft einem Gehalt von feiner Stärke, wodurch der Übergang zu den Ersatzfasern gegeben ist. Solche Spiralbandfasern stellen ein wertvolles elastisches Festigungselement dar.

Bei den eigentlichen Holzfasern fehlen die Hoftüpfel und Spiralbänder völlig. Dafür ist die Micellierung flach spiralig. Ihre Resultante ergibt eine Quermicellierung beim Betrachten mit den Nikols. Um diese immerhin ziemlich seltene Anordnung der Membranelemente zu zeichnen, haben wir je eine Mikrophotographie einer Holzfaser (*H*) und eines Markstrahles (*G*) hergesetzt. Da die Wand im optischen Schnitte immer mehr oder weniger im Sinne der Längsausdehnung micelliert erscheint, so kann sie als Vergleich dienen. Die Photos wurden mit gekreuzten Nikols und $\frac{1}{4}$ λ -Glimmerplättchen aufgenommen. Die Subtraktionsschwärzung und Additionsaufhellung ist in der Flächenansichtswand in beiden Fällen antagonistisch zum optischen Schnitt.



- A* Phloëmparenchym in Benzazurinfärbung ohne Nikol, die gekreuzten Fila zeigend.
- A'* Desgleichen in Chlorzinkjodreaktion, Nikol + zur Zelle.
- B* Desgleichen mit Benzazurin Nikol einer Filarrichtung parallel und zu dieser in Plusstellung.
- B'* Dasselbe Bild in Chlorzinkjodreaktion.
- C* Eine Parenchymzelle beginnt in Chlorzinkjod etwas zu quellen. Der Nikol steht in mittlerer Stellung zu beiden Richtungen.
- C'* Desgleichen nur der Nikol in Plusstellung zu einer Richtung.
- D* Spangenfila in der Tüpfelschließhaut mit Nikol und Chlorzinkjod.
- E* Tangentialwände der unverholzten Markstrahlen in Benzazurin, die Retefilierung zeigend.
- F* Spiralband einer Tracheide in Chlorzinkjod; am Rande der Bänder heben sich Fila violett hervor. Sie sind in Plusstellung zum Nikol aufgenommen.
- F'* Dasselbe Präparat in Minusstellung.



G Markstrahlzelle in Macerat in Subtraktionsstellung zum $\lambda/4$ -Glimmerplättchen als Micellierung quer zur Längsachse der Zelle.

G' Ebenso, nur in Additionsstellung.

H Holzfaser in Subtraktionsstellung.

H' in Additionsstellung zum $\lambda/4$ -Glimmerplättchen. Die Micellierung ist also bei diesem Libriform quer.

I Markstrahlzelle in Chlorzinkjodfärbung. In der lamellierten Wand verlaufen Fila pericellular und kommen daher dunkel heraus.

Alle Bilder mit $1/12$ Immersion 10fach und Mikas Aufsatz $1/3$, aufgenommen mit Leicakamera. Die Abzüge vergrößert. *A* bis *F'* und *I* mit starkem Gelbfilter aufgenommen.

Es entspricht H der Subtraktions-, H' der Additionsstellung der Flächenansichtswand der Holzfaser, G und G' den entsprechenden Stellungen der Markstrahlen. Das Mikrophotographieren erfolgt am besten nach diesem Verfahren, da schwarze und helle Färbung sich gut festhalten läßt.

Die Micellierung streicht in höchstens 20–30 Grad zur Längsachse der Zellen. Alle möglichen Übergänge führen zu Ersatzfasern und selbst Holzparenchym. Die Zuspitzung der Enden verstumpft sich, die Lumina werden breiter und immer mehr Stärke füllt die Zellen. Die einfachen Tüpfel werden immer zahlreicher. Die Micellierung streicht fast quer bis unter 10–15 Grad. Bei diesen Zellen trifft man wieder mit Chlorzinkjod oder Benzazurin Fila am Schnitttrande an. Mitunter erkennt man Fila auch in der intakten Wand streichend, ohne daß sie mit den viel breiteren Spiralbändern verwechselt werden dürfen. Mit Phasenkontrast und Nikol kann man die oben angeführten Streifungs- und Beschattungsphänomina aufdecken.

Im ganzen genommen kann man eine Streichrichtung aller die Festigung vermittelnden Membranelemente, seien es nun Spiralbänder, Fila oder Micelle, in flacher Spirale aufzeigen und hat damit eine Erklärung für die gummiartige Ziehbarkeit (Duktilität) des ganzen Holzkörpers und damit des ganzen Sprosses. Der leptonische Bau ist somit der Schlüsselpunkt für das physiologisch-anatomische Verhalten und die Biologie des Sprosses von *Clematis* durch seinen Aufbau aus lauter elastisch ziehbaren Flachspiralen. Man kann von einem Verbundbau sprechen (Ziegenspeck 1943, 1948, Walter 1946).

Wesentlich abweichend sind die umfangreichen Markstrahlen. Ihre radial gestreckten Zellen haben, wie im Bilde G und G' festgehalten ist, eine quer hierzu und parallel zum Stengel gerichtete Micellierung. Die Zellquerschnitte des Tangentialschnittes des Sprosses lassen eine lamellierte Sekundärwand erkennen. Darüber hinaus kann man mit Chlorzinkjod oder Benzazurin deutliche abweichend färbbare Fila in dieser pericellulären Richtung streichen sehen. Die dunklen, infolge Dichroismus in verschiedenen Lagen zum Nikol sich dunkler oder heller hervorhebenden Kreisbögen der Mikrophotographie I sind diese durch das Gelbfilter besonders hervorgehobenen Fila in der Chlorzinkjodfärbung.

Auf den Nachweis der Fila bei der Quellung der Macerationsprodukte in Kupferoxydammon können wir hier nicht eingehen, um den Umfang der Arbeit nicht zu überdehnen. Wir betonen, daß dies ebenso wie in Ziegenspeck (1951) gelingt.

Zusammenfassung

1. Der flachspiraligen Anordnung der Bauelemente mikroskopischen und submikroskopischen Umfanges verdankt der Sproß von *Clematis Vitalba* L. seine elastische Ziehbarkeit (Duktilität). Diese Anordnung eignet sowohl Phloëm wie Xylem.

2. Mit Hilfe von Phasenkontrast und Nikol sowie mit dichroitischer Färbung gelang der Nachweis von Fila in allen möglichen Wandungen. Die Fila sind Bauelemente, welche mit diesen verfeinerten lichtmikroskopischen

Methoden nachgewiesen werden können und in der Größenordnung den Mikrofibrillarbündeln der Elektronenmikroskopie entsprechen.

Diese Fila, von filum der Faden, sind also ihrerseits wieder aus Mikrobrillen zusammengesetzt, welche nicht oder kaum in den Auflösungsbereich des Mikroskops fallen. Sie haben wieder einen Aufbau aus Micellen kristallinen Bereiches (siehe Kratky 1951), welche nur durch die Polarisationsmikroskopie erschließbar und durch die Röntgenologie meßbar sind. Fila finden sich nicht bei allen Wandungen der Pflanzen, sondern nur bei solchen mit straff gerichteter Festigung; wir nennen diese kaum gestreut micellaten Wandungen dann eufilat.

3. Mit Hilfe dieser verfeinerten Lichtmikroskopie gelingt der Nachweis der Fila in den umfangreichen Schließhäuten der Tüpfel, die im Umkreise zirkulär micellat erscheinen. Damit werden sie durch Spangenfila mehr oder minder allseitig zugfest. Ebenfalls sind die Bilder mit denen der Elektronenmikroskopie homolog (Retefilierung).

Die paramicellare Festigkeit und der Gegenmicelldehnungssatz (Ziegenspeck) haben ihre Gültigkeit behalten, wenn sie auch durch die Erkenntnis der Mikrobrillen und Fila präzisiert werden können.

Literatur

- Czaja, 1930: Die Analyse der metachromatischen Färbungen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 48, 100.
- Darwin, Ch., 1899: Die Bewegung und Lebensweise der kletternden Pflanzen. Ges. Werke, 2. Aufl. Stuttgart.
- Eichler, 1934: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Verholzung und Lignin. Zellulosechemie 15, 114.
- Frey-Wyssling, 1928: Das Wesen der Chlorzinkjodreaktion. Jahrb. wiss. Bot. 67, 597.
- 1938: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Protoplasma-Monographien 15.
- 1949: Fortschritte der Botanik. XII, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Mühlethaler, 1948: Experientia 4, 475.
- Fuchs-Ziegenspeck, 1925: Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen. Mez. Archiv XII.
- Huber, 1928: Jahrb. wiss. Botanik 67, 877.
- Kerner von Marilaun, 1888: Pflanzenleben, 1. Bd. Leipzig.
- Kratky, 1951: Größe und Form der kristallinen Bereiche in festen polymeren Stoffen. Kolloidtschr. 120, 24.
- Künemund, A., 1932: Die Entstehung verholzter Lamellen. Mez. Archiv, 24.
- Lehrbuch der Botanik (Bonner), 1947. Jena, Fischer.
- Metzner, 1930: Über das optische Verhalten der Pflanzengewebe im langwelligen UV-Licht. Planta 70.
- 1930: Einfache Einrichtung zur Fluoreszenzmikroskopie. Biologia generalis VI. Mez, zitiert nach Ziegenspeck 1945.
- Migula, 1926: Pflanzenbiologie. 2. Aufl. Leipzig.
- Mohl v., 1827: Über den Bau und das Winden der Ranken- und Schlingpflanzen, Mühlethaler, 1950: Die Struktur der Zellwände. Orion 5, 26—30.
- Neger, 1913: Biologie der Pflanzen auf experimenteller Grundlage. Stuttgart.

- Rasdorsky, W., 1925—1930: Über die Reaktion der Pflanzen auf mechanische Inanspruchnahme. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 43, 44, 46, 48.
- 1937: *Biologia generalis*, XII.
- Reichert, Gebrauchsanweisung für die große Fluoreszenzeinrichtung Lux UV. Wien.
- 1944: Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen. Wien.
- Schaede, 1940: Feinbau der Parenchymmembran. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 58, 271.
- Sonntag, 1909: Die duktilen Pflanzenfasern, der Bau ihrer mechanischen Zellen und die etwaigen Ursachen der Duktilität. *Flora* 99, 204.
- Steinbrinck, 1927: Zum Feinbau und zur Physik natürlicher Pflanzenfasern. *Die Naturwissenschaften* 50, 978.
- 1930: Zur Physik der natürlichen Pflanzenfasern. *Technologie d. Textilfasern V*.
- Tobler, 1939: *Handbuch der Pflanzenanatomie IV*.
- Walter, 1946: *Grundlagen des Pflanzenlebens*. 2. Aufl. Stuttgart.
- Wergin, 1942: *Kolloidtschr.* 98, 131: 100, 436.
- 1943: Über den Feinbau der Zellwände. *Biol. Zentralbl.* 63, 350.
- 1950: Neue Erkenntnisse der Zellwandforschung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 63, 19.
- Williams-Wyckoff, 1944: *J. appl. Phys.* 15, 712.
- Wyckoff-Frey-Wyssling-Mühlethaler, 1948: *Experientia* 4, 475.
- Ziegenspeck, H., 1924: Sparstärke. *Mez. Archiv VII*, 251—271.
- 1931: Über Zwischenzustände bei der Bildung verholzter Membranen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 49, Stuttgart.
- 1936: Orchideen, in *Lebensgeschichte der Blütenpflanzen Mitteleuropas*. Stuttgart.
- 1938: Die Micellierung der Turgeszenz und Wachstumsmechanismen. *Mez. Archiv* 39, 268—306.
- 1939: Desgl. *Biologia generalis* 14, 266—283 und 507—541.
- 1940: Dichroskopie und Metachroskopie. *Protoplasma* 35.
- 1941: Metachroismus und Dichroismus. *Kolloidtschr.* 97, 201—210.
- 1943: Federfestigung und Dehnbarkeit. *Beih. Bot. Centrbl.* 62, 78—106.
- 1943: Desgl. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 66, 1, 17—19.
- 1948: Die Bedeutung des Feinbaues der Pflanzenwand für die phys. Anatomie. *Mikroskopie III*, 72—85.
- 1951: Der submikroskopische Bau des Holzes, in *Holzanatomie*, ined.

A Molecular Interpretation of Toxicity

By

William Seifriz¹

With 2 Text-figures

(Received March 30, 1951)

Introduction

Experimental work in the past has shown that the degree of toxicity of the respective members of a homologous series of compounds increases with each succeeding member in the series. This fact indicates that toxicity is in some way related to the physical and chemical properties of the respective reagents, a rather obvious conclusion but with no indication of the particular property which is responsible. One such series of experiments was that involving work by Gibbs, Traube, Freundlich [1], and Warburg [2]. Traube discovered that the succeeding members of a homologous series of alcohols or fatty acids are concentrated in increasing amounts in the surfaces of their solutions. His deduction was a corollary of Gibbs' principle of surface concentration. Freundlich found a similar relationship between the position of the members of a series and the amount adsorbed by charcoal; and Warburg followed with the experimental proof that alcohols narcotize tadpoles more effectively the higher they are in their homologous series.

Similar correlations have been found between the toxicity of metallic ions and certain of their physical properties [3], of gases and their isosteric properties [4], and of organic compounds and their molecular pattern [5].

From the foregoing work it seemed likely that the saturated hydrocarbons would show increasingly toxic effects with each advanced position in the homologous series. This expectation was verified, but only through the application of pressure could toxicity values for the lighter hydrocarbons be obtained. Realizing that the alcohols, when studied from the

¹ My assistant, Mr. Hans Pollack, was responsible for the early experiments on the hydrocarbons with Mr. Ariel Loewy contributing. Later work on the alcohols was primarily in the hands of Mr. S. C. Cheng. In Europe, I had the pleasure of discussing the problems of this paper with Mr. Charles Spierer whose comments added much to an understanding of the subject. I am also indebted to Dr. E. Newton Harvey for the loan of a high pressure chamber, and to Mr. Edward R. Boedeker for critical reading of the manuscript. To the Growth Committee of the Cancer Research Fund I owe an expression of gratitude for financial support of this research.

same point of view, would add to an understanding of the toxicity of the hydrocarbons, they, too, were included in this study of the correlation between toxicity and physical-chemical properties.

Material and Method

The living matter on which the results here reported are based is the myxomycete, or mycetozoon, *Physarum polycephalum*. Subcultures of this organism are made from a parent culture by placing bits of the plasmodium on agar-coated slides, waiting for the small culture to spread, then placing it in an inverted position over a moist chamber, or inserted into the pressure chamber, in which position the condition of the protoplasm is microscopically determined.

The mold *Physarum* is a multinucleate, non-cellular mass of protoplasm which is in a constant state of rhythmic flow. The degree of activity of the protoplasm, e. g., the rate of streaming, serves as an indicator of the condition of the organism. The cessation of streaming may be due to death, hibernation, or narcosis. The term narcosis, or anesthesia, when applied to a slime mold simply means "suspended animation".

The principle hydrocarbons used were methane, ethane, propane, and butane. Several other hydrocarbons and organic compounds were applied but the effects of only two of them, ethylene and butene-1, shall be given consideration here. The gases were obtained in commercial steel cylinders and were of the highest purity available. Those gases which were applied at atmospheric pressure entered the moist chamber at a constant and specific rate. When necessary, the gas was diluted with air in large Erlenmeyer flasks and forced out by hydrostatic pressure. The gases administered under pressure entered a metal chamber capable of withstanding pressures up to 1000 pounds per square inch (henceforth p.s.i.). The gases were applied at pressures ranging from 20 to 400 p.s.i. The protoplasm in the steel bomb was microscopically viewed through a glass window in the metal wall of the cylinder. In order to be sure that none of the effects observed was due to pressure alone, control cultures were exposed to the inert and noble gases, nitrogen, helium, and argon, each at more than 600 p.s.i. No pathological damage was noted for periods ranging over half an hour.

Experimental

Methane has no effect on the slime mold *Physarum* when applied at atmospheric pressure. When the pressure is raised to 150 p.s.i., protoplasmic flow ceases for some 30 seconds and then recovers while still exposed to the gas under pressure. The same is true at a pressure of 250 p.s.i.; streaming stops and within a short time restarts under pressure. There is no noticeable damage.

The first permanent anesthesia with methane is produced between 299 and 365 p.s.i. depending on the resistance of the individual specimens. The protoplasm recovers in every instance if the pressure is released within a short time. Exposures from 30 to 60 seconds were found to be safe.

The time required for full recovery when the mold is returned to air at atmospheric pressure ranged from 2 to 5 minutes.

The slime mold proved to be very resistant to methane at pressures below that causing anesthesia. One specimen was observed under 150 p.s.i. of methane for more than an hour, yet showed no signs of injury. It was also observed that the mold in the presence of a gas develops an immunity. Specimens which had been previously treated required considerably higher pressures for anesthesia on second application.

Ethane, like methane, has no effect at atmospheric pressure. The gas must be applied at 64 to 89 p.s.i. to produce anesthesia. There is no damage, and recovery is complete when the gas is not applied for too long a time.

Propane produces anesthesia at a pressure as low as 25 p.s.i. The margin of safety is relatively wide. The slime mold recovers without damage. Pressures lower than 25 p.s.i. have no effect.

Butane is the first gas of the series to produce anesthesia at atmospheric pressure. It, as in the case of all the previous gases, was given undiluted, until found to be highly toxic. Subsequent doses were diluted with oxygen. The best anesthesia is obtained at concentrations between 40 and 50 per cent. At lower concentrations butane stops protoplasmic streaming, but only temporarily.

Ethylene had, in earlier experiments, been found to be ineffective as an anesthetic agent. It was actually slightly stimulating, a surprising fact in view of the known anesthetic affect of ethylene on human beings. When ethylene is applied to a slime mold plasmodium at atmospheric pressure it has no noticeable effect; there is no damage and no cessation of protoplasmic flow, but at a pressure of from 76 to 101 p.s.i. ethylene is a good anesthetic agent.

Butene-1, proved to be somewhat more toxic than butane. At atmospheric pressure it produced safe anesthesia in concentrations ranging from 30 to 40 per cent. At lower concentrations anesthesia was incomplete. Fifty per cent butene-1 is extremely toxic when applied for more than one minute. The pathological changes of the protoplasm are then conspicuous, ranging from local syneresis and mild blistering to discoloration and formation of large islands of permanently clotted protoplasm.

The experimental results, in so far as they apply to the myxomycete *Physarum*, are presented in the following Table I wherein are given the pressures at which each hydrocarbon gas will produce anesthesia, together with some physical-chemical properties of the gases.

The Effect of Some Hydrocarbons on Mice

Research on so primitive a form of life as a myxomycete is often viewed as having no bearing on human or other mammalian protoplasm; a comparable series of experiments was therefore made on mice. The gases were all applied at atmospheric pressures. The results correlate perfectly with

those on slime mold protoplasm, as the following data show. Only ethylene is an exception, as already noted.

Methane: A mouse exposed to an atmosphere of nine parts methane and one part oxygen for twelve minutes shows no pathological signs or harm other than a slight increase in respiratory rate.

Ethane: A mouse exposed to nine parts ethane and one part oxygen will, within 3 minutes, exhibit definite signs of irritation and excitation. There is spontaneous urination and defecation, increase in respiratory rate, and extreme restlessness. After 7 minutes the mouse exhibits loss of equilibrium and partial paralysis of the hind legs. Anesthesia is not produced.

Propane: When propane is applied with oxygen in the proportion 9:1, it will cause an initial excitation. After five minutes exposure the

Table I. Hydrocarbons.

	Average pressure per mm Hg ²	Relative solubility in ether or hexane	Boiling point °C	Critical temp. °C	Mol. Wt.	Millimols adsorbed per gr. of carbon ³	Van der Waals' constant
Methane CH ₄	17,000	91 cm ³	- 161	- 82	16	1.71	0.376 × 10 ⁵
Ethane C ₂ H ₆	4,000	Hex 335 cm ³	- 88	+ 32	30	3.73	1.074 × 10 ⁵
Propane C ₃ H ₈	1,380	926 cm ³	- 42	+ 97	44	6.67	1.760 × 10 ⁵
Butane C ₄ H ₁₀	342	2980 cm ³	- 0.5	+ 146	58	8.00	2.712 × 10 ⁵

mouse falls with signs of light anesthesia. Recovery is almost instantaneous.

Butane: A mouse exposed to butane and oxygen at 9:1 soon shows pronounced trembling and slight convulsions. It dies within two minutes. Mixed with oxygen in the proportion of 1:1 butane is lethal in ten minutes time.

The Normal Primary Alcohols

The prediction that there is a close correlation between the toxicity of a substance and its position in a homologous series has just been shown to be true for the hydrocarbons. That we may anticipate the same for the alcohols has been intimated, indeed, is proved by earlier work.

The living material used was the same for the alcohols as for the hydrocarbons, and the method similar except that no pressures were employed;

² This is the total pressure necessary to cause cessation of all movement: the pressure in Hg has been converted from pounds per sq. inch.

³ These data are from K. J. Uehara, Chem. Soc., Japan, 57, 531 (1936); 60, 1149 (1939).

the protoplasm was simply bathed in the alcohol solutions. The criterion of toxicity was, as before, cessation of flow, i.e. narcosis, with notice being taken of any form of visible damage.

The reagents were the normal alcohols, from methyl to lauryl. Beyond heptyl the series was incomplete, nonyl and undecyl being unavailable; therefore, only methyl to heptyl will be considered in detail.

The insolubility of the higher alcohols in water necessitated the use of a fat solvent; nujol oil was chosen. Nujol oil is inert in so far as its effect on protoplasm is involved. Some half dozen isomers of the normal alcohols were also applied but there was no evident, clear-cut correlation with toxicity.

The experimental results are presented in the following Table II, in

Table II.
Normal Primary Alcohols.

Alcohol	Molarity	Activity	
		Coef. f.	A
Methyl .	0.4—0.6	.0187	1.51
Ethyl . .	0.3—0.4	.0235	3.69
Propyl .	0.15	.0392	14.4
Butyl . .	0.05	.0479	52.9
Amyl . .	0.03—0.04	.1355	214
Hexyl . .	0.01—0.02	.1626	903
Heptyl .	0.01	.641	3560

The molarity given in column 2 is that concentration of alcohol necessary to stop protoplasmic movement within ten minutes.

Table III.
Precipitation of a Protein Extract from Physarum by Normal Primary Alcohols.

Alcohols	Molarity	Activity of the Mean Molarity
Methyl .	0.6	0.0165
Ethyl . .	0.48	0.0326
Propyl .	0.3—0.4	0.0927
Butyl . .	0.1—0.2	0.1445
Amyl . .	0.04—0.05	0.1742
Hexyl . .	0.01	0.1629
Heptyl .	0.01—0.03	1.286

terms of the molarity of each alcohol required to produce anesthesia, i.e. to stop flow within ten minutes. Included in the Table are several physical-chemical properties of the alcohols.

It is often instructive to study the effect of reagents on a constituent of tissue which has been extracted therefrom. In Table III is given the relative precipitating power of the alcohols on a protein extract from the slime mold. The extract was obtained by weighing equal amounts of slime mold and blending with alkaline 0.6 M KCl. The suspension was then centrifuged and the supernatant dialyzed against 0.3 M KCl for 3 days at 3° C.

If the molarities of the alcohols which cause anesthesia of the living substance (Table II) and the activities of the mean molarities of the alcohols which precipitate the protein extract (Table III), are both plotted against the number of carbons in the alcohols, the curves in Fig. 1 are obtained. The relationships between these four properties are here revealed.

Discussion

Among the thermodynamic properties of hydrocarbons and alcohols only those which correlate with toxicity are included in the foregoing tables, though not all of these. Whereas fat solubility shows perfect parallelism with toxicity, water solubility shows no such correlation. Boiling point decreases rapidly as toxicity increases but melting point remains fairly constant. Critical temperature runs parallel to toxicity whereas critical pressure shows no correlation. The dielectric constants of the first seven alcohols decrease, from 33 to 6.7, in perfect correlation with the position in the series and therefore with increasing toxicity, which is also true of the square root of the heat of vaporization of the gases (7).

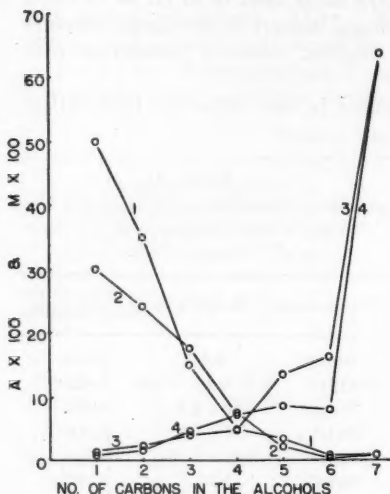


Fig. 1.

The graph shows the relationship between the length of the chains of the various alcohols and the concentrations necessary to stop all movement of the protoplasm: 1: the molarities of the alcohols which produce anesthesia. 2: the molarities of the alcohols which precipitate the protein extract. 3: the activities of the mean molarities of the alcohols which produce anesthesia. 4: the activities of the mean molarity of the alcohols which precipitate the protein extracts.

substance and upon it must a toxic substance act if a pathological condition or death is to result. It is here, within the cell, that a reaction between protoplasm and poison takes place; and here we deal with proteins, not fats. However, fat solubility may be the explanation of a poisonous effect if the fat is a constituent of the living protein complex. Where lipid

Among the numerous properties of the hydrocarbons and the alcohols which correlate with toxicity, the biologist will immediately select lipid solubility, for this is an old theory, i.e., the relative dissolving power of the cell lipoids. I have long opposed the lipid hypothesis because it calls attention to the most obvious relationship. This relationship may have a diagnostic quality and as such it indicates that a change has occurred. The lipid theory centers attention on one of the least significant materials in the living cell. Substances which bulk large, such as fats and carbohydrates, are not therefore the most vital. I have also opposed the hypothesis because it has to do with the cell surface rather than the cell interior. An oil film on the surface of protoplasm is an important part of a cell. It may determine what shall enter and what not. But the substance within is the living

solubility determines degree of toxicity, it is likely to do so because a lipoprotein is attacked. Furthermore, alcohols are not only fat solvents, they are good protein precipitants. Rendering a living protein less soluble is likely to be more damaging to a cell than dissolving fats.

Holding, perhaps, second place to lipoid solubility as an explanation of narcosis, is the relative permeability of the cell for narcotic agents. The two theories may be one and the same but they need not be, for change in permeability, to water, for example, need not involve the cell fats. The permeability hypothesis is of little value taken alone because many narcotic agents, including all of the familiar alcohols, penetrate a cell so rapidly that not nearly enough difference between them can be detected to be used as an explanation of their relative narcotic action. Far more significant is the activity of the alcohols which increases two to five times with each member in the series, with each additional CH_2 group.

Whereas emphasis in this article is laid on the physical-chemical properties of the reagents, physiological relations such as that between toxic agent and respiration or oxygen availability must be recognized. Protoplasm possesses a strong affinity for oxygen. Any substance tending to decrease oxygen solubility will poison living tissue. The affinity of a given fatty material for simple hydrocarbon gases would increase with the molecular weight of the gas and, in fact, would increase in an asymptotic manner with increasing molecular weight. If we accept molecular weight as a crude measure of the size of the hydrocarbon molecule, this would mean that with increasing size a smaller amount would be necessary to take up a given space in protoplasm. The filling of this protoplasmic space might result in a decreased accessibility for oxygen, and then one could account for the poisoning phenomena noted.

The relative higher poisoning ability of paraffins as compared to olefins may be due to unsaturation in the olefin (ethylene) molecule. Because of this unsaturation the molecule may exert some affinity for oxygen, thus resulting in a decreased poisoning effect.

Turning, now, to another very interesting correlation, to which my attention was called by Mr. Boedeker, Henry's law finds an application to relative toxicity. Henry's law relates the solubility of a gas in a solvent by the following equation:

$$p = k c$$

where p is the pressure (mm. Hg) and c is the concentration. If we express c in the units cc. gas/100 ml. water, then the dimensions of the Henry's law constant will be mm. Hg/cc. gas/100 cc. water. In Table IV are the values of k calculated from solubility data for $p = 760$ mm.

The equation for Henry's law can now be applied to the experimental data here presented, and thus can one calculate the volume of gas dissolved at the pressure required to cause cessation of protoplasmic movement. This is given in column 4 of Table IV.

One thus sees why, as the molecular weight of a gas increases, smaller amounts are required for poisoning. This last relationship may be expres-

sed as a curve, with cc. of gas dissolved at cessation of protoplasmic movement as ordinate, and molecular weight of gas as abscissa (Fig. 2).

Before turning to a general conclusion, reference should be made to what little literature is available on thermodynamic interpretations of toxicity. Ferguson [8] advanced the idea that the wide range of molarity required by different narcotics to produce the same effect can be clustered to a narrow range if thermodynamic activity values are used. Brink and Posternak [9] present a theoretical treatment of the effective concentrations of narcotics and advance Ferguson's original idea, but they do not agree with him that the thermodynamic activities required to produce equal effects increase progressively in a homologous series of compounds. Our experiments support Ferguson's view. Brink and Poster-

Table IV. Solubility of Hydrocarbons in Water at 1 Atmosphere.

Hydrocarbon	Solubility (cc. gas/100 ml. of H ₂ O at 17° C.)	Henry's Law Constant <i>k</i>	cc. of Gas Dissolved <i>c</i>	Molecular Weight of gas
Methane . .	3.5	217	79.1	16
Ethane . . .	5.1	149	26.8	30
Propane . .	6.5	117	11.8	44
Butane . . .	15.0	50.7	6.7	58

c = volume of gas dissolved at pressure required for cessation of movement

nak do, however, arrive at two general conclusions with which I am in complete agreement, namely, equal degrees of narcosis are produced at equal levels of thermodynamic activities. Where orderly relations in relative effectiveness are concealed, possibly the narcotics attack different substances which make up the structure of the cell.

General Conclusions

Reviewing the various properties of the hydrocarbons and alcohols set forth in the preceding tables, it would be impossible to single out that property which should be regarded as responsible for toxicity; and there are still other properties such as length of carbon chain, polarity, and surface tension, all of which correlate. As one surveys the respective lists the first impression is one of confused complexity and this forces some investigators to regard biological and medical phenomena, such as toxicity, anesthesia, selective permeability, etc., if not beyond interpretation at least beyond a single interpretation for all situations. But a moment's thought reveals a common factor involved in all columns of the four tables, and that common factor is molecular cohesion. All of the changes in the physical and chemical properties of the gases and solutions noted in the tables may be interpreted in terms of molecular cohesion. To start with a simple case: alcohol is said to lower the surface tension of water; it does so by lowering molecular cohesion; and here let me add an important fact,

molecular cohesion is not lowered at the surface alone but throughout the liquid. Because of a reduction in molecular cohesion alcohol lowers the boiling point, raises critical temperature, solubility, and activity.

It is thus evident that to lay undue emphasis on the surface of a cell, as in the theory of lipid solubility, is erroneous, for it is not only nor primarily the outer surface of protoplasm which is affected by a penetrating solution. I would say that the physical-chemist is also guilty of leaving the impression that a surface change is restricted to the surface. Surface phenomena such as those in which Langmuir has been interested, i.e. the spreading of oils at surface, bring about a change which is purely a surface one. This is so because the substances are not miscible with the dispersion medium. But when the change in surface forces is produced by a water-soluble substance, by ether, alcohol, or a hydrocarbon of low molecular weight, then the change is not restricted to the surface but occurs throughout the liquid.

Surface tension is due to the greater cohesion between surface molecules compared with that of the inner molecules. When tension at the surface is modified by the addition of alcohol, the alcohol permeates the entire liquid and the cohesion between all molecules is reduced. What we observe is a change in tension at the surface due to a reduction in cohesion; this we measure and record. We fail to take note of the entire event. A far better term than surface tension, in the present case, would be "molecular tension." There has been a change in molecular cohesion throughout the system, one result of which has been a disturbance in surface equilibrium, but the more important change, from a toxicity point of view, is the disturbance in internal equilibrium.

The relative toxicity of the members of a homologous series of hydrocarbons or alcohols is therefore due to a reduction in molecular cohesion. Such an interpretation is in agreement with previous hypotheses based on lipid solubility, surface tension changes, reversible gelation, hydration, "activity," effective concentration, and similar thermodynamic properties. The experimenter has in each case attributed relative toxicity to the change which he has observed.

That relative toxicity is a matter of relative solubility is an old hypothesis and in part true, but it is not sufficient. Sugar and some salts are

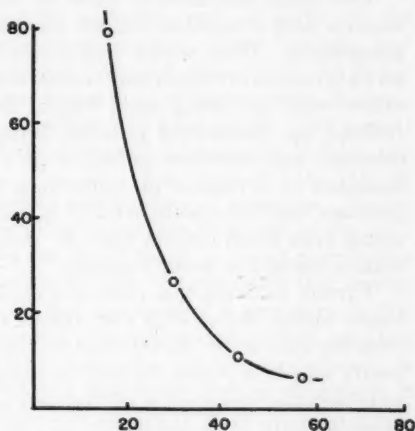


Fig. 2. Ordinates are cc. of gas dissolved at cessation of protoplasmic movement. Abcissae are molecular weight of gas.

highly soluble yet have no pathological effect comparable to that of an alcohol. The toxic agent must bring about a reduction in molecular cohesion.

An interpretation of the significance of all the thermodynamic properties of a toxic agent may be ventured through the concept of molecular cohesion; thus, molecular weight, which at first appeared to be of little significance, is a factor in determining molecular cohesion. This is true because the field of molecular attraction surrounding smaller particles is a more concentrated one. Molecular cohesion is therefore greatest in those alcohols of smallest molecular weight and diameter. As molecular weight and diameter increase when ascending the series, cohesion is reduced, and toxicity increases, until a critical maximum is reached.

One could undoubtedly show an interesting effect of chain length on toxicity were it possible to carry the series of hydrocarbons to molecules of greater size. There would very likely be a maximum toxicity value at an intermediate molecular weight beyond which toxicity would now decrease with increasing chain length, the long chains of the heavy hydrocarbons, e.g. commercial paraffin, being ineffective in lowering molecular cohesion, and therefore ineffective as a toxic agent. That this is true is indicated by a number of facts: thus, the activity of a homologous series increases until maximum activity is reached usually at or near nine carbon atoms, after which activity falls off. Adsorption also increases until a maximum is reached at about 9 carbons.

Further evidence that there is a decline in the toxicity of alcohols with longer carbon chains after a maximum is reached, is to be had from the incomplete data on the higher alcohols dissolved in nujol oil. These alcohols are poorly soluble in water. In order to have a complete series, all of the alcohols were therefore dissolved in oil. In these solutions toxicity first increases then decreases until at 10 carbons the toxicity is as low as that of the two carbon alcohol; at 12 carbons the toxicity is barely noticeable. A 14 carbon alcohol would probably be wholly non-toxic. It is an interesting and significant fact that the alcohols with odd numbers of carbons are less toxic than those with an even number of carbons.

We may thus reduce all modifications in the thermodynamic properties of the hydrocarbons and alcohols to one basic change, namely, a change in molecular cohesion, and then attribute toxicity to this change no matter how it is accomplished. The soundness of this reasoning is evident on considering what a change in molecular cohesion, when pronounced, will mean to so delicately balanced a system as protoplasm. It will mean disorganization. One need only observe the effect of caffeine on protoplasm to see how great is the disorganization due to a reduction in molecular cohesion. The delicately balanced living system literally falls apart.

Stimulants solate and depressants gelate protoplasm [10]. When the effect is moderate, the physiological state of the protoplasm passes from a normal condition to excitability on the one, solation, side, and to narcosis on the other, gelation, side. When the effect is great, death results in either direction.

The change in molecular cohesion which results in the disruption of protoplasmic organization, may be expressed in one of a number of ways, as a change in surface tension, permeability, viscosity, elasticity, or structural continuity, but the result is the same, the living structural units are given greater freedom of movement, and as a result they may go into solution or they may aggregate. Which they do will in some measure be determined by the specificity of the reaction between the toxic substance and the protoplasmic constituents. No matter what form toxicity may take, the affinity of some protoplasmic components for the toxic substance will always be a factor, but usually a minor factor in comparison to the thermodynamic properties of the agent.

Molecular cohesion in living matter obviously includes the bonding, or interlocking, of high molecular weight polymers, such as make up the protein framework of protoplasm. Lateral ties, cross linkage, and hydrogen bonds are involved in the solution and gelation of the living protein complex. In short, molecular cohesion in whatever form, determines the physiological or pathological condition of protoplasm. The normal state of protoplasm involves a specific degree of aggregation; in fact, this may be advanced as a general law of nature. The work of Joly [11, 12] shows this to be true in a wide variety and number of instances. To cite but one of his observations: he finds that in surface films and in the bulk of certain substances, the molecules are never found in equal distribution but always in groups, provided there is motion. He concludes that motion is necessary to life, and I would add that aggregation is necessary to life. When the normal state of aggregation of protoplasm is disturbed, as when a stimulant such as caffeine is added, molecular cohesion is reduced; in colloidal terms, solution occurs. When a depressant such as chloroform is added to protoplasm, molecular cohesion is increased, or, in colloidal terms, gelation occurs.

We thus come to a general theory of toxicity, that of a change in molecular cohesion. One theory for all cases of toxicity will meet with some opposition, but to arrive at more and more general formulas is the way of science.

Literature

- [1] Freundlich, H.: *Colloid and Capillary Chemistry*, Berlin 1932.
- [2] Warburg, O.: *Biochem. Zeitschr.* 119, 134 (1921).
- [3] Seifriz, W.: *Science* 110, 193 (1949).
- [4] — and H. Pollack: *Archives des Sciences*, Geneva, Switzerland 1949.
- [5] — — *Protoplasma* 39, 55 (1949).
- [6] Uehara, K.: *J. Chem. Soc. Japan* 57, 531 (1936); 66, 1149 (1939).
- [7] Schmidt, O.: *Z. physik. Chem.* 153, 265 (1928).
- [8] Ferguson, J.: *Proc. Roy. Soc., B*, 197, 587 (1939).
- [9] Brink F., and J. M. Posternak: *J. Cell. Comp. Physiol.* 52, 211 (1948).
- [10] Seifriz, W., and Pollack, H. L.: *J. Coll. Sci.* 4, 19 (1949).
- [11] Joly, M.: *Biochem. et Biophys. Acta* 2, 624 (1948).
- [12] Joly, M.: *J. Coll. Sci.* 5, 49 (1950).

Über die Volumenabnahme des Zellkernes in der Plasmolyse und über das Zustandekommen der Kernplasmarelation

Von

Karlis Abele

(Zur Zeit: The University of Adelaide, Waite Agricultural Research Institute, Adelaide, South Australia)

(Eingelangt am 22. März 1951)

I. Einleitung

Die meisten Arbeiten, die das Verhalten der Zellkerne während der Plasmolyse der Zelle verfolgen, beschäftigen sich mit der Quellung der Kerne über die normale Größe hinaus. Die Anzahl solcher Arbeiten ist keineswegs gering wie auch der zur Verquellung der Kerne angewendeten Mittel. Auf eine nähere Besprechung der Ergebnisse in dieser Richtung kann ich hier nicht eingehen. Die Entquellung der Zellkerne und die damit verbundene Volumenabnahme der Kerne wie überhaupt das Verhalten der Kerne während der Plasmolyse in den entquellenden Plasmolyticis verfolgen dagegen nur wenige Arbeiten. Die Volumenabnahme der Zellkerne haben Němec (1910), Strohmeyer (1933) und Weber (1930) beobachtet. Haberlandt (1919) und Bělař (1912) haben zwar den Kern in der mit hypertonischen Medien plasmolysierten Zelle untersucht, ihre Aufmerksamkeit galt aber anderen zytologischen Vorgängen, nicht der Volumenveränderung der Zellkerne. Němec wies auf die Volumenabnahme des Kernes in plasmolysierten Zellen von *Vicia faba* hin. Strohmeyer hat nach Plasmolyse in 0,8 mol. Traubenzucker die Kerne in den Blattrandhaaren von *Tradescantia* gemessen. Dabei fand er, daß im Mittelwert die Kerne in der plasmolysierten Zelle etwa 50% ihres Volumens eingebüßt haben. Weber berichtet über eine Vakuolen-Kontraktion in vital gefärbten *Elodea*-Zellen, wobei die Vitalfärbung eine Art von Kappenplasmolyse auslöste. Weber fand dabei, daß die Kerne eine Volumenverminderung erfahren haben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Beobachtungen über das Verhalten des Zellkernes während der Plasmolyse der Zelle, insbesondere über die durch den Wasserverlust verursachte Volumenabnahme und über die Wiedergewinnung der ursprünglichen Größe während der Deplasmolyse. Es wird angenommen, daß die Kerngröße hauptsächlich von dem jeweiligen Quellungsstande des Kernes abhängig ist. Daher wird die Kernplasmarelation nicht als ein besonderes Problem angesehen.

II. Methodisches

Wegen der kugelförmigen Gestalt der Kerne wählte ich für meine Untersuchungen und Messungen die Zellen der unteren Blattepidermis von

Aspidistra elatior. Auf die kugelförmigen Kerne dieser Pflanze haben bereits Klienberger (1918) und Monschau (1930) hingewiesen. Allen Berechnungen der Volumenveränderung lagen mikrophotographische Aufnahmen von Kernen zugrunde. Bei der Aufnahme wurden die Konturen der Kerne scharf eingestellt. Für die Mikrophotographie wurde die Zusammenstellung Contax-Miflex von C. Zeiss (mit dem Einstellungsfernrohr) verwendet, die Optik des Mikroskops stammte ebenfalls von C. Zeiss — die Öl-Immersion 60 mit num. Ap. 1,40 und das Kompensationsokular 10. Die Plasmolyse wurde folgenderweise ausgeführt. Als Plasmolytikum wurde Saccharose verwendet. Es wurden 0,3–0,8 mol. Lösungen von Saccharose in je 0,1 mol. Abstufungen in Leitungswasser hergestellt. Diese Lösungen wurden mit einer Pipette unter das Deckgläschen des Präparats gebracht, wo ein Rasiermesserschnitt der Epidermis lag. Von der anderen Seite des Deckgläschens wurde das Wasser mit einem Streifen Filtrierpapier abgesaugt. Die Plasmolyse wurde mit 0,3 mol. Lösung begonnen. Nach je 10 Minuten wurde die folgende, um 0,1 mol. höhere Konzentration genommen. Als die Konzentration 0,8 mol. erreicht war und durch wiederholtes Hinzufügen der Saccharoselösung sowie durch wiederholtes Absaugen mit dem Filtrierpapier gesichert war, daß die Schnitte auch wirklich in einer nahezu 0,8 mol. Saccharoselösung lagen, wurde die Plasmolyse als beendet betrachtet. Die Zellen waren stark plasmolysiert. Durch das Eintauchen der Schnitte, z. B. in eine Uhrschale mit der Saccharoselösung, wäre die bestimmte Konzentration freilich genauer erreicht, aber eine größere Genauigkeit schien mir hier belanglos zu sein.

Nachher wurden die Zellen deplasmolysiert, wobei wieder stufenweise um je 0,1 mol. schwächere Saccharoselösungen genommen wurden. Die folgende, niedrigere Konzentration wurde ebenfalls nach je 10 Minuten hinzugefügt, so daß eine langsame und allmähliche Deplasmolyse zustande kommen konnte. Diese Art der Deplasmolyse vertrugen die Zellen gut und starben selbst nach einer mehrmaligen Plasmolyse und Deplasmolyse nicht ab. „Auch hochgradige Entquellung tötet die Zelle nicht ab“ (Bělař 1929, S. 391). Nachher wurden die Saccharosereste mit Wasser entfernt. Somit war die Deplasmolyse beendet. Die Kerne wurden vor der Plasmolyse, also in der turgeszenten Zelle, in der Plasmolyse, und nachher in der Deplasmolyse der Zelle photographiert. Wurde Plasmolyse und Deplasmolyse wiederholt, so wurden die Kernaufnahmen ebenfalls wiederholt. Die Kerne der mikrophotographischen Negative wurden vergrößert auf Papier projiziert und gezeichnet, alle Kerne bei derselben Vergrößerung (1330mal). Diese Vergrößerung ergibt genügend große Flächen für die spätere Messung. Die Messung erfolgte mit dem Planimeter. Der Wert einer Planimeter-Noniuseinheit betrug 5 mm². Dieser Wert ist also auch als die Genauigkeitsgrenze der Messungen anzusehen. Die Planimetermessungen erlauben die Kernoberflächen und die Kernvolumina $\frac{4}{3}\pi r^3$ der 1330mal vergrößerten Kerne zu berechnen, unter der Voraussetzung, daß die Kerne regelmäßig kugelförmig sind. Die so gewonnenen Werte wurden für alle hier vorliegenden Berechnungen verwendet. Die von dem Kerne im photographischen Bilde eingenommene Fläche entspricht dem Grundriß des Ker-

nes, die Planimetermessung dieser Fläche ergibt den Flächeninhalt seines Großkreises. Der Kürze wegen habe ich in den Tabellen durchweg die Bezeichnung „Grundriß“ gebraucht.

Alle Berechnungen wurden mit einem Rechenschieber ausgeführt. Dieses schien mir zulässig, da die Kerne doch nicht ganz genau kugelförmig sind, wie bei der Berechnung der Oberfläche und des Volumens angenommen wurde, auch, ferner, die Planimetermessungen die Flächen von Grundrissen nicht genau ergeben. Also schien mir eine größere Genauigkeit bei der Berechnung überflüssig zu sein. Außerdem kommt es auf ein zahlenmäßig genau ausgedrücktes Resultat der Messungen nicht an. Ob der Kern von seinem Volumen in der gegebenen Konzentration der Saccharose etwa 5% mehr oder weniger einbüßt, ist nicht wichtig. Wesentlich ist es festzustellen, daß der Kern überhaupt an Volumen verliert und daß es überhaupt möglich ist, diesen Verlust in den meisten Fällen annähernd zu berechnen. Fallen die meisten berechneten Werte eindeutig aus, so ist das Ergebnis glaubwürdig, wenn auch die einzelnen Werte voneinander abweichen.

Alle Beobachtungen wurden durchweg an lebendigem Material gemacht. Dadurch ist jeglicher Fehler ausgeschlossen, der durch die Volumenveränderung des Kernes bei der Fixierung auftreten könnte (vgl. Hertwig 1931).

III. Eigene Untersuchungen

A. Über das Verhalten des Zellkernes während einmaliger Plasmolyse und darauffolgender Deplasmolyse

Tab. 1 enthält die Zahlen aus den Messungen an zehn Kernen: Die mikrophotographischen Aufnahmen der Kerne erfolgten: 1. vor der Plasmolyse, als die Zelle turgeszent war (Spalte „Turgor I“), 2. in der Plasmolyse mit 0,8 mol. Saccharose (Spalte „Plasmolyse“) und 3. nach der beendeten Deplasmolyse, als die Zelle wieder wassergesättigt war (Spalte „Turgor II“).

Aus der Tab. 1 ist ersichtlich, daß der Kern in der Plasmolyse an Volumen eingebüßt hat; dieses beträgt jetzt etwa 50–60% des Volumens im turgeszenten Zustande. Bei der darauffolgenden Deplasmolyse wird der Kern größer. Nach beendeter Deplasmolyse hat der nun turgeszente Kern in den meisten Fällen sein ursprüngliches Volumen erreicht, das er vor der Plasmolyse besaß. Es sind in der Tab. 1 die Veränderungen der Kernoberfläche und des Kernvolumens angegeben.

Während der Plasmolyse habe ich den Kern auch in der Grenzplasmolyse photographiert. Die entsprechenden Berechnungen zeigten, daß der Kern bereits zu Beginn der Plasmolyse kleiner geworden ist, bis zur endgültigen Plasmolyse nimmt aber das Volumen noch weiter ab. Ebenfalls nimmt der Kern allmählich an Volumen zu, wenn die plasmolysierte Zelle deplasmolysiert wird. Gewöhnlich ist der Kern bereits größer geworden, wenn der Protoplast die Zellmembran berührt, obwohl die Turgorgröße noch nicht erreicht ist. Mitunter verzögert sich aber die Volumenabnahme und ist in der Grenzplasmolyse noch nicht bemerkbar. In der Deplasmolyse hat manchmal der Kern bereits seine Endgröße erreicht. Es schien mir zwecklos, genauer hierüber zu berichten.

Tabelle 1.

	Turgor I	Plasmolyse	Turgor II
1. Kern			
Grundriß, mm ²	195	140	195
Oberfläche, mm ²	780	560	780
Verhältnis, %	100	72	100
Volumen, mm ³	2050	1246	2050
Verhältnis, %	100	61	100
2. Kern			
Grundriß, mm ²	180	140	180
Oberfläche, mm ²	720	560	720
Verhältnis, %	100	78	100
Volumen, mm ³	1820	1246	1820
Verhältnis, %	100	68	100
3. Kern			
Grundriß, mm ²	190	125	200
Oberfläche, mm ²	760	500	800
Verhältnis, %	100	66	105
Volumen, mm ³	1975	1053	2130
Verhältnis, %	100	53	108
4. Kern			
Grundriß, mm ²	160	105	160
Oberfläche, mm ²	640	420	640
Verhältnis, %	100	66	100
Volumen, mm ³	1527	810	1527
Verhältnis, %	100	53	100
5. Kern			
Grundriß, mm ²	195	145	185
Oberfläche, mm ²	780	580	740
Verhältnis, %	100	74	95
Volumen, mm ³	2050	1315	1895
Verhältnis, %	100	65	94
6. Kern			
Grundriß, mm ²	195	135	185
Oberfläche, mm ²	780	540	740
Verhältnis, %	100	69	95
Volumen, mm ³	2050	1182	1895
Verhältnis, %	100	59	94
7. Kern			
Grundriß, mm ²	220	135	200
Oberfläche, mm ²	880	540	800
Verhältnis, %	100	61	91
Volumen, mm ³	2475	1182	2130
Verhältnis, %	100	48	86

	Turgor I	Plasmolyse	Turgor II
8. Kern			
Grundriß, mm ²	180	100	175
Oberfläche, mm ²	720	400	700
Verhältnis, %	100	56	97
Volumen, mm ³	1820	753	1740
Verhältnis, %	100	41	96
9. Kern			
Grundriß, mm ²	200	135	175
Oberfläche, mm ²	800	540	700
Verhältnis, %	100	68	88
Volumen, mm ³	2130	1182	1740
Verhältnis, %	100	55	82
10. Kern			
Grundriß, mm ²	205	110	205
Oberfläche, mm ²	820	440	820
Verhältnis, %	100	54	100
Volumen, mm ³	2185	867	2185
Verhältnis, %	100	40	100

B. Einwirkung einer länger andauernden Plasmolyse auf den Kern

Um die Einwirkung einer länger andauernden Plasmolyse auf den Kern zu prüfen, wurden die Schnitte in 0,8 mol. Saccharoselösung auf längere Zeit belassen. Die turgeszenten Kerne vor der Plasmolyse wurden photographiert. Die zweite photographische Aufnahme erfolgte nach der Überführung in 0,8 mol. Saccharoselösung. Weitere Aufnahmen folgten nach 24, 48 und 120 Stunden. Tab. 2 enthält die Messungen von vier Kernen, die auf diese Weise plasmolysiert und photographiert wurden. Fünf Tage andauernde Plasmolyse vertrugen die Zellen und die Kerne ohne merklichen Nachteil. Wenn der Zellkern in der Plasmolyse einmal sein Volumen verringert hatte, behielt er dieses Volumen während der ganzen Dauer der Plasmolyse.

Um der Verdunstung des Wassers und der damit verbundenen Erhöhung der Konzentration vorzubeugen, wurden die plasmolysierten Schnitte in verschleißbare Glasröhrchen mit 0,8 mol. Saccharoselösung gebracht und nur für die kurze Zeit der Kontrolle aus dem Röhrchen genommen.

Obwohl Schwankungen des Kernvolumens, wie die Messungen zeigen, stets vorkommen, ist doch das Ergebnis eindeutig.

C. Mehrmalige Plasmolyse

Ferner wurde das Verhalten der Kerne in mehrmaliger, aufeinanderfolgender Plasmolyse untersucht. Dazu wurden normale turgeszente Zellen (Turgor I, Tab. 3) plasmolysiert. Diese Plasmolyse ist in Tab. 3 als „Plasmolyse I“ bezeichnet. Nach Plasmolyse I wurden die Zellen vorsichtig deplasmolysiert, indem sie auf je 10 Minuten in 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, und 0,3 mol. Saccharoselösungen kamen. Darauf folgte das Leitungswasser. Als die

Zelle und der Kern wieder turgeszent waren, wurde der Kern photographiert („Turgor II“). Diesem Turgor folgte Plasmolyse, „Plasmolyse II“, die ebenso wie die erste ausgeführt wurde, dann abermals Deplasmolyse, „Turgor III“, dann wieder Plasmolyse, „Plasmolyse III“, und Deplasmolyse, „Turgor IV“, bis die Zellen dreimal plasmolysiert und dreimal deplasmolysiert waren. In

Tabelle 2.

	Turgor	Plasmolyse	Plasmolyse nach 24 Std.	Plasmolyse nach 48 Std.	Plasmolyse nach 120 Std.
1. Kern					
Grundriß, mm ²	250	115	100	135	120
Oberfläche, mm ²	1000	460	400	540	480
Verhältnis, %	100	46	40	54	48
Volumen, mm ³	2972	927	752	1183	990
Verhältnis, %	100	31	25	40	33
2. Kern					
Grundriß, mm ²	240	140	135	155	155
Oberfläche, mm ²	960	560	540	620	620
Verhältnis, %	100	58	56	65	65
Volumen, mm ³	2800	1246	1183	1454	1454
Verhältnis, %	100	45	42	52	52
3. Kern					
Grundriß, mm ²	220	170	170	160	160
Oberfläche, mm ²	880	680	680	640	640
Verhältnis, %	100	77	77	73	73
Volumen, mm ³	2460	1670	1670	1522	1522
Verhältnis, %	100	68	68	62	62
4. Kern					
Grundriß, mm ²	230	125	145	145	145
Oberfläche, mm ²	920	500	580	580	580
Verhältnis, %	100	54	63	63	63
Volumen, mm ³	2628	1052	1315	1315	1315
Verhältnis, %	100	40	50	50	50

jeder Plasmolyse und in jedem darauffolgenden Turgorzustand wurde der Kern photographiert. Wie in Plasmolyse, so auch im Turgor blieb der Kern etwa 10 Minuten.

Wie die Tab. 3 zeigt, erreichen die Kerne nach jeder Deplasmolyse annähernd das ursprüngliche Volumen. Einzelne Kerne jedoch vergrößern in der Deplasmolyse ihr Volumen nur um ein geringes, können aber keineswegs das ursprüngliche Volumen zurückgewinnen (z. B. Kern 6, Tab. 3). In darauffolgenden Plasmolysen reagieren diese Kerne allerdings noch mit einer merkbaren Volumenabnahme, aber geringer, die normale Turgorgröße, „Turgor I“, wird aber nie mehr erreicht.

Tabelle 5.

	Turgor I	Plasmolyse I	Turgor II	Plasmolyse II	Turgor III	Plasmolyse III	Turgor IV
1. Kern							
Grundriß, mm ²	185	125	160	150	180	145	180
Oberfläche, mm ²	740	500	640	600	720	580	720
Verhältnis, %	100	68	87	81	98	78	98
Volumen, mm ³	1895	1052	1522	1383	1817	1315	1817
Verhältnis, %	100	53	80	73	96	70	96
2. Kern							
Grundriß, mm ²	225	200	225	160	230	160	215
Oberfläche, mm ²	900	800	900	640	920	640	860
Verhältnis, %	100	89	100	71	102	71	96
Volumen, mm ³	2540	2128	2540	1522	2628	1522	2372
Verhältnis, %	100	84	100	60	104	60	93
3. Kern							
Grundriß, mm ²	200	160	195	170	215	180	190
Oberfläche, mm ²	800	640	780	680	860	720	760
Verhältnis, %	100	80	98	85	108	90	95
Volumen, mm ³	2128	1522	2054	1670	2372	1872	1973
Verhältnis, %	100	72	97	79	111	85	93
4. Kern							
Grundriß, mm ²	170	125	160	130	150	115	160
Oberfläche, mm ²	680	500	640	520	600	460	640
Verhältnis, %	100	74	94	77	88	68	94
Volumen, mm ³	1670	1052	1522	1115	1383	927	1522
Verhältnis, %	100	60	91	67	83	55	91
5. Kern							
Grundriß, mm ²	125	100	155	100	150	115	130
Oberfläche, mm ²	500	400	620	400	600	460	520
Verhältnis, %	100	80	124	80	120	92	104
Volumen, mm ³	1052	752	1454	752	1383	927	1115
Verhältnis, %	100	72	138	72	131	88	106
6. Kern							
Grundriß, mm ²	270	180	205	165	200	185	195
Oberfläche, mm ²	1080	720	820	660	800	740	780
Verhältnis, %	100	67	76	61	74	69	72
Volumen, mm ³	3315	1817	2210	1596	2128	1895	2054
Verhältnis, %	100	55	67	48	64	57	61

IV. Besprechung der Ergebnisse

Alle hier vorliegenden Messungen sind an Epidermiszellen der Blattunterseite von *Aspidistra latior* ausgeführt. Die hypertonische Saccharoselösung entzieht dem Protoplasma Wasser, die Zellen werden plasmolysiert. Wie die Beobachtungen zeigen, büßt der Zellkern bereits zu Beginn der Plasmolyse einen Teil seines Volumens ein. Parallel mit der fortschreitenden Plasmolyse wird der Verlust an Kernvolumen immer größer. Dieser Verlust des Volumens wird durch die Deplasmolyse wieder ausgeglichen. Die Verminderung des Volumens ist daher als Wasserverlust zu deuten.

In den drei Tabellen ist durchweg nur eine kleine Anzahl von Kernen angeführt. Es schien mir überflüssig, die Zahl der Messungen zu steigern; diese Messungen sollten ja keinen Beleg für genauere variationsstatistische Berechnungen geben, ihre Aufgabe besteht lediglich darin, die beobachteten Erscheinungen zu illustrieren und ein zahlenmäßiges Bild zu vermitteln. Dazu kommt noch der Umstand, daß ein ergänzendes Zahlenmaterial, sollte es überhaupt je nötig sein, jederzeit leicht zu verschaffen ist. Daher habe ich es unterlassen, die vorliegende Mitteilung mit einem größeren Zahlenmaterial zu belasten.

Was die erste Tabelle betrifft, so kann man vielleicht fragen, weshalb nicht alle Kerne in der Plasmolyse den gleichen Volumenverlust erfahren. Darauf kann geantwortet werden, daß ein Unterschied zwischen den einzelnen Kernen zwar besteht, jedoch nicht allzugroß ist. Die Messungen an den zehn Kernen zeigen, daß der Verlust an Volumen in der Plasmolyse ungefähr 50% beträgt. Aber, wie schon gesagt, erstreben die Messungen nicht, irgendwelche genauer berechnete Werte für die Volumenabnahme zu geben. Für die weiteren Ausführungen ist es vollkommen gleichgültig, ob der Kern tatsächlich 50% Volumenverlust erfährt oder aber der Verlust durch einen anderen, allerdings naheliegenden Prozentsatz ausgedrückt wird. Zu demselben Ergebnis, daß die Kerne etwa 50% Volumenabnahme erfahren, ist übrigens auch Strohmeier auf Grund der Messungen an *Tradescantia*-Kernen gekommen (1935, S. 488). Strohmeier plasmolysierte die Zellen mit 0,8 mol. Traubenzucker und berechnete die Volumenabnahme der Zellkerne in der Plasmolyse als $\text{Vol}_{\text{normal}} : \text{Vol}_{\text{plasmol}}$. Auf diese Weise berechnet, ergab der Mittelwert 2,00 : 1,00.

Es wäre wohl anzunehmen, daß die Kerne der Epidermiszellen, die, abgesehen von den Schließzellen und Nachbarzellen der Spaltöffnungen (deren Kerne nicht gemessen wurden), ziemlich gleichmäßig sein dürften, auf die Plasmolyse auch mit dem gleichen Volumenverlust der Kerne antworten werden. Warum das nicht der Fall ist und wie diese abweichenden Ergebnisse zustande kommen, ist schwer zu sagen. Einen gewissen Anteil könnten daran die bei der Messung begangenen Fehler haben, die durch die von der Kugelform abweichende Kerngestalt und durch die bei der Messung entstandenen Ungenauigkeiten bedingt sind. Auch könnten die Zellwände eine variable Wasserdurchlässigkeit besitzen, die manchmal in der Epidermis in einer sehr ausgeprägten Form vorkommen kann (vgl. Bělař 1929b, S. 116). Schließlich wäre es ebenfalls denkbar, daß auch in einzelnen Kernen gewisse Unterschiede in dem Quellungsvermögen bestehen können. Auch

die Kernmessungen von Strohmeier (l.c.) stimmen, was die Schwankungen in der Volumabnahme betrifft, mit den hier vorliegenden ungefähr überein. Abgesehen von diesen Schwierigkeiten in der Beurteilung der Messungen dürften die Ergebnisse als eindeutig bezeichnet werden.

Ungefähr dasselbe läßt sich auch über die vier Kerne der Tab. 2 sagen. Obwohl auch hier die Kerne nicht die gleiche Volumabnahme aufweisen, sind die Ergebnisse ziemlich eindeutig. Nachdem die Kerne in den ersten 24 Stunden in 0,8 mol. Saccharoselösung einen Teil des Volumens verloren haben, ruft ein weiteres Verbleiben in der Saccharose während der nächsten 120 Stunden keine weitere deutlich wahrnehmbare Volumabnahme hervor. Allerdings scheint die Volumabnahme bei dem 1. Kern der Tabelle etwas zu groß zu sein.

Wie die Messungen der Tab. 3 zeigen, kehrt der Kern selbst nach dreimaliger Plasmolyse in der Deplasmolyse wieder zu seinem ursprünglichen Volumen zurück. Allerdings kommen unter den Kernen solche vor, die das normale Turgorvolumen nach der Deplasmolyse nicht mehr zurückgewinnen. Dieser Erscheinung könnte eine Veränderung, „Müdigkeit“ der Semipermeabilität der Kernmembran oder die Veränderung der Quellungsfähigkeit der Kernkolloide zugrunde liegen. Die Fähigkeit, auf die Plasmolyse mit Volumabnahme und auf die Deplasmolyse mit Volumzunahme zu reagieren, haben jedoch auch solche Kerne nicht gänzlich verloren. Nach der ersten Plasmolyse haben diese Kerne in der deplasmolysierten Zelle immerhin eine Volumenzunahme erfahren, obgleich das normale, ursprüngliche Volumen nicht mehr zurückgewonnen wird. Ebenfalls ist in der zweiten und in der dritten Plasmolyse eine Volumenabnahme deutlich bemerkbar wie auch eine genügend ausgeprägte Volumenzunahme in der zweiten und in der dritten Deplasmolyse (Turgor III und Turgor IV), obgleich auch in diesen Fällen das ursprüngliche Volumen des turgeszenten Kernes nicht mehr erreicht wird. In der Plasmolyse scheint hinsichtlich des Volumens kein Unterschied zwischen den eben erwähnten und den übrigen Kernen zu bestehen. Daraus kann gefolgert werden, daß der Kern bei der Entquellung bzw. in der Plasmolyse in allen Fällen Wasser bis zu derselben Quellungsstufe verliert, jedoch haben die Kerne, die das ursprüngliche Volumen nicht wiedergewinnen können, ihre Quellungsfähigkeit zum Teil eingebüßt. Als Beispiel kann der 6. Kern in der Tab. 3 gelten. Ganz kurz möchte ich noch auf den 5. Kern hinweisen. Die Volumina „Turgor II“ und „Turgor III“ scheinen hier zu groß zu sein. Ob man bei Kern 1 und 4 bereits von einem wenn auch nur wenig ausgeprägten Verlust der Quellungsfähigkeit nach der Plasmolyse sprechen kann, muß dahingestellt bleiben.

Der Verlust an Wasser im Protoplasma kann entweder auf osmotischem Wege zustande kommen oder aber als eine Entquellung aufgefaßt werden. Da die Kernmembran als semipermeabel gilt, sind die Vorbedingungen für osmotische Vorgänge gegeben. Auch an quellungsfähigen Verbindungen fehlt es dem Zellkern nicht. Sowohl das Karyotin als auch die Karyolymphe können quellen und entquellen. „Die Karyolymphe ist demnach eine kolloide Lösung von sehr großer Stabilität. In Kalisalzlösungen nimmt sie auf osmotischem Wege reichlich Wasser auf. Wir müssen diese Wasseraufnahme,

solange nicht weitere Möglichkeiten erwiesen sind, als Quellung bezeichnen“ (Strugger, 1930, S. 378). Da die Lebensvorgänge an eine bestimmte Quellungsstufe gebunden sind, da diese notwendige Quellung das Leben erst ermöglicht, muß der Kern seinen Wassergehalt der durch die Quellung verursachten Wasseraufnahme verdanken. Es ist daher verständlich, daß durch diese bestimmte Quellungsstufe der Kern eine ganz bestimmte Größe erhält. Die Volumenverminderung ist als eine Entquellung aufzufassen. Diese Auffassung kann nach den Arbeiten von Walter (1923, 1924), Plowe (1931) und Lepeschkin (1938 u. a.) als begründet gelten. Wie die Arbeiten von Walter zeigen, stehen die osmotischen Vorgänge im Protoplasma in gewissen Beziehungen zu dem Quellungsvermögen. Es muß daher angenommen werden, daß parallel der Wasseraufnahme oder Wasserabgabe durch die Quellung bzw. Entquellung die osmotische Aufnahme oder Abgabe von Wasser abläuft. „Die Frage, ob im Plasma Quellungen oder osmotische Kräfte wirksam sind, läßt sich nicht entscheiden. Zwischen Quellung und Osmose besteht kein prinzipieller Unterschied; der Übergang von der einen Art der Erscheinungen zur anderen ist ein ebenso allmählicher wie z. B. von einer kolloiden Lösung zu einer molekulardispersen“ (Walter 1924, S. 413). — „A combination of colloidal and osmotic theory seems necessary to account for the behaviour of the nucleus“ (Plowe, l. c., S. 216). Zu demselben Schluß kommt Lepeschkin in seiner Kolloidchemie des Protoplasmas (1938, S. 66). Eine scharfe Trennung zwischen den osmotischen und den Quellungsvorgängen wäre folglich nicht angebracht. Küster bezeichnet zwar die osmotische Wasseraufnahme in den Gel-Kernen als Schwellung, um sie von der Quellung zu unterscheiden (1935, S. 153), fügt jedoch hinzu: „Es ist sehr schwer in einzelnen Fällen zu entscheiden, ob Quellung oder Schwellung vorliegt.“ Die Quellung und die osmotischen Vorgänge lassen sich nach Walter ferner von einem Gesichtspunkte aus betrachten. Jede Lösung und jeder Quellkörper besitzt eine bestimmte Saugkraft. Die Saugkraft des quellenden Plasmas muß stets der Saugkraft des Zellsaftes gleich sein. Deshalb muß die Quellung stets in bestimmten Beziehungen zum osmotischen Wert des Zellsaftes stehen.“

Aus dem Gesagten kann der Schluß gezogen werden, daß die jeweilige Größe des Zellkernes als eine Funktion der zur Zeit bestehenden Quellungsverhältnisse und der osmotischen Kräfte aufzufassen ist. Mit der Änderung des Quellungszustandes bzw. der osmotischen Kräfte muß auch die Änderung des Kernvolumens erfolgen. Für die hier vorliegenden Ausführungen ist es nicht wichtig, in welchem Ausmaße der Kern seine Wasseraufnahme den osmotischen Vorgängen oder der Quellung verdankt, ebenfalls ist es nicht wichtig, wie sich die osmotische Saugkraft zu der Quellungs-Saugkraft verhält.

Die hier angeführten Beobachtungen weisen darauf hin, daß der Zellkern eine elastische Membran besitzt. Gegen das Vorhandensein einer Kernmembran bestehen zur Zeit wohl keine Bedenken mehr. „... die Zahl der Autoren, die eine Kernmembran in irgendeiner Form leugnen, nimmt von Jahr zu Jahr ab“ (Tischler 1934, S. 172). Und weiter: „Es ist wohl nicht zu kühn, wenn wir den normalen Aufbau der Kernmembran uns stets im

Sinne eines semipermeablen Häutchens vorstellen“ (Tischler, l. c., S. 176). Seifriz hat die Kernmembran sogar mit der Nadel eines Mikromanipulators „like a thin veil“ vom Kern abheben können (1936, S. 61). Es gibt auch zahlreiche andere Beobachtungen, wo die Kernmembran mehr oder weniger klar gesehen ist. Auf die verschiedenen, zum Teil voneinander abweichenden Ansichten über die Natur der Kernmembran kann ich hier nicht eingehen, zumal die Zahl der betreffenden Arbeiten keineswegs gering ist. Die hier vorliegenden Beobachtungen zeigen, daß diese Kernmembran elastisch ist. Verliert der Kern an seinem Volumen, so folgt die Membran dem nun kleiner gewordenen Kern, der Kern verliert nie seine kugelige Gestalt. „*Datura*“-Kerne wurden nicht beobachtet. Nach der beendeten Deplasmolyse erreicht der Kern seine ursprüngliche Größe wieder. Wurde der Kern dreimal der Reihe nach plasmolysiert und deplasmolysiert, so folgte immer die dehbare und elastische Kernmembran den Volumenveränderungen des Kernes. „The nucleus springs back to its original shape when the needle is brought to rest. This experiment may be repeated many times, and the nucleus invariably straightens out“ (Plowe, l. c., S. 215). Und weiter: „The nuclear material, while highly elastic and showing the properties of a hydrophilic colloid, nevertheless is part of the osmotic system which the entire nucleus constitutes“ (Plowe, l. c., S. 219). Küster gibt an, daß die Membran, die den Zellkern in den plasmolysierten Zellen umspannt, nur ein geringes Maß von Dehnbarkeit besitzt, da sie bei fortgesetzter (über das normale Volumen hinaus) Wasseraufnahme platzt. Es könnte sein, daß die Kernmembran über das normale Volumen des Zellkernes hinaus wenig dehnbar ist. Bei der Volumabnahme des Zellkernes unter das normale Volumen und bei einer Wasseraufnahme in der Deplasmolyse bis zu seinem normalen Volumen scheint jedoch die Kernmembran elastisch und dehnbar zu sein. Daß der Kern während der Deplasmolyse die normale Kerngröße nicht überschreitet, zeigt, daß die Kernmembran semipermeabel ist, daß der Kern während der Plasmolyse nichts von den Verbindungen verloren hat, die seiner Quellungsfähigkeit oder seinen osmotischen Kräften zugrunde liegen. Auch eine länger andauernde Plasmolyse verändert die osmotischen Eigenschaften bzw. die Quellungsfähigkeit der Kerne nicht. Wird die Zelle fünf Tage in 0,8 mol. Saccharoselösung belassen, so erfahren die Kerne, die zu Beginn der Plasmolyse kleiner geworden, während der fünf Tage keine weitere Volumveränderung. Wie Höfler (1926, S. 458) nachgewiesen hat, wird während einer Plasmolyse in der Saccharoselösung die Saccharose in das Protoplasma aufgenommen, der Rückgang der Plasmolyse ist zwar langsam, aber immerhin feststellbar. Die in das Protoplasma aufgenommene Saccharose scheint den Kern während der fünf Tage noch nicht zu beeinflussen. Es ist zu vermuten, daß die Kernmembran für die Saccharose nicht durchlässig und von einer anderen selektiven Beschaffenheit wie die Plasmamembran ist. Werden die Zellen nach der fünftägigen Plasmolyse deplasmolysiert, so wird das Wasser in die Zelle aufgenommen. Aber auch der Kern nimmt Wasser auf und gewinnt seine normale und ursprüngliche Größe wieder.

Antwortet der Kern auf eine hypertonische Lösung mit Volumabnahme

und auf die Deplasmolyse mit Rückkehr zu seinem ursprünglichen Volumen, so ist die jeweilige Kerngröße als eine Funktion des osmotischen bzw. des Quellungs-Gleichgewichtes zwischen Kern und Plasma aufzufassen. Dementsprechend kann auch die Kernplasmarelation nicht als eine Beziehung *sui generis* zwischen dem Kernvolumen und dem Zellvolumen gedacht werden. Sie ist vielmehr als das Gleichgewicht osmotischer Kräfte bzw. das Quellungs-Gleichgewicht zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma aufzufassen. Das sichtbare Ergebnis dieses Gleichgewichtes ist die Kerngröße. Es kann eingeworfen werden, daß nur die Wasseraufnahme oder die Wasserabgabe, das eigentliche Kernwachstum aber in keiner Weise berücksichtigt wird. Dagegen wäre zu erwidern, daß das Wachstum freilich nicht unberücksichtigt gelassen werden kann. Die durch das Wachstum neugebildete Kernsubstanz bestimmt die Kerngröße indirekt dadurch, daß sie eine Vermehrung der quellbaren Bestandteile des Kernes bedeutet. Also kommen wir schließlich doch auf die Quellung zurück. „Wir wollen uns daran erinnern, wie gerade die im Chromatin vorhandene, ja dieses hauptsächlich ausmachende Thymonucleinsäure die besondere Eigenschaft hat, Wasser anzuziehen und damit Gallertcharakter anzunehmen“ (Tischler, 1934, S. 434). Ist der Kern gewachsen, so kann er bei der Quellung Wasser in größerer Menge als vorher aufnehmen und auf diese Weise sein Volumen noch mehr vergrößern. Die beträchtliche Menge des aufgenommenen oder abgegebenen Wassers scheint aber die Kerngröße weit mehr zu beeinflussen als das eigentliche Wachstum.

Ist nun die Kerngröße hauptsächlich durch die Quellungsvorgänge bedingt, so scheint es auch verständlich zu sein, daß die vielen Berechnungen der Kernplasmarelation (K/P) nie zu einem einheitlichen Resultat gebracht werden konnten. Die Erklärung ist in den recht verschiedenen Quellungsbedingungen nicht nur in verschiedenen Pflanzenarten, sondern auch in verschiedenen Geweben einer Pflanze zu suchen. Wo diese Quellungsbedingungen annähernd gleich sind, ist auch die K/P annähernd gleich, so z. B. die K/P in den gleichen Geweben verschiedener Pflanzen derselben Art. In mancher Hinsicht ähnlich ist die Meinung von L. von Bertalanffy: „Daraus ergibt sich leicht, daß das konstante Verhältnis zwischen Kern und Plasma immer dort zutage tritt, wo die physikalischen und physiologischen Bedingungen der verschiedenen Zellen identisch sind, wie in homologen Zellen haploider, diploider usw. Individuen, daß aber — nach dem oben Gesagten — das Verhältnis K/P äußerst wechselnde Werte annehmen muß, wenn verschiedene Zellarten verglichen werden.“ Wo die Kerne reich an Karyotin sind, zum Beispiel in den zahlreichen Fällen der „lebhaft funktionierenden“ Zellen, sind auch die Kerne groß, da der an quellungsfähigem Karyoplasma reiche Kern mehr Wasser aufzunehmen imstande ist. Daß das Karyoplasma die Kernmembran prall und elastisch macht, ist in vielen Fällen beobachtet. Der Anstich mit einer Nadel des Mikromanipulators läßt gewöhnlich den Kern zusammensinken. Durch die hier vorgetragene Auffassung der Regulation des Kernvolumens müßte auch der alte Streit fallen, ob bei der K/P das Volumen oder die Oberfläche des Kernes das Wichtigste und das Maßgebendste bei der Bildung einer „Relation“ ist.

V. Zusammenfassung

1. In mit 0,8 mol. Saccharoselösung plasmolysierten Zellen der unteren Blattepidermis von *Aspidistra elatior* erfährt der Kern Volumverminderung, die etwa 50% seines Volumens beträgt. Diese Volumabnahme ist als Wasserverlust zu deuten. Während der Deplasmolyse nimmt der Kern wieder Wasser auf und erreicht nach der beendeten Deplasmolyse sein ursprüngliches Volumen wieder; dieses wird nicht überschritten.

2. Bei einer fünf Tage andauernden Plasmolyse wird nach der am Anfang der Plasmolyse stattgefundenen Volumabnahme des Kerns eine weitere Volumenverminderung nicht mehr beobachtet. Es ist anzunehmen, daß die Kernmembran für die Saccharose nicht durchlässig und von einer anderen selektiven Beschaffenheit ist wie die Plasmamembran.

3. In der dreimal nacheinander plasmolysierten und deplasmolysierten Zelle antwortet der Kern auf die Plasmolyse mit Volumabnahme, auf die Deplasmolyse mit Volumzunahme, die bis an das ursprüngliche Volumen reicht, dieses aber nicht überschreitet.

4. Die Kernmembran folgt den Volumveränderungen des Kernes. „*Datura*“-Kerne wurden nicht beobachtet. Der Kern besitzt eine elastische, dehnbare und semipermeable Kernmembran.

5. Die Kernvolumenveränderungen in der Plasmolyse werden durch die Aufnahme oder die Abgabe von Wasser bedingt. Der Wasseraufnahme und der Wasserabgabe liegen die osmotischen Kräfte des Karyoplasmas und das Quellvermögen der Kernkolloide zugrunde.

6. Das Kernvolumen wird hauptsächlich durch die Menge des in den Kern aufgenommenen Wassers bedingt.

7. Da das Kernvolumen hauptsächlich von dem Quellungsvermögen bzw. von der osmotischen Saugkraft des Karyoplasmas abhängig ist, kann die K/P-Relation nicht als eine Beziehung besonderer Art aufgefaßt werden. Die jeweilige K/P-Relation ist das sichtbare Gleichgewicht zwischen der osmotischen Saugkraft von Kern und Zytoplasma.

Literatur

- Bělař, K., 1929 a: Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose II. Untersuchungen an den Spermatocyten von *Chorthippus (Stenobothrus) lineatus* Panz. Archiv Entwicklungsmechanik 118 359—484.
- 1929 b: Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginica*. Zeitschrift Zellforschung und mikr. Anatomie 10, 73—134.
- Bertalanffy, L. v., 1932: Theoretische Biologie I. Berlin.
- Haberlandt, G., 1919: Zur Physiologie der Zellteilung. Dritte Mitteilung. Sitzungsberichte Preuss. Akad. Wissenschaften 20, 322—348.
- Hertwig, G., 1931: Der Einfluß der Fixierung auf das Kern- und Zellvolumen. Zeitschrift mikrosk.-anat. Forsch. 23, 484—504.
- Höfler, K., 1926: Über die Zuckerpermeabilität plasmolysierter Protoplaste. Planta 2, 454—475.
- Klienberger, Emmy, 1918: Über die Größe und Beschaffenheit der Zellkerne mit besonderer Berücksichtigung der Systematik. Beihefte Botan. Zentralblatt 35, 219—278.

- Küster, E., 1921: Über Schwellungsdeformationen bei pflanzlichen Zellkernen. Zeitschrift wiss. Mikroskopie 38, 350—357.
- 1935: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Lepeschkin, W. W., 1938: Kolloidchemie des Protoplasmas. II. Auflage. Dresden und Leipzig.
- Monschau, M., 1930: Untersuchungen über das Kernwachstum bei Pflanzen. Protoplasma 9, 536—575.
- Némec, B. 1910: Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. Berlin.
- Plowe, Janet Q., 1931: Membranes in the plant cell. I. Morphological membranes at protoplasmatic surface. Protoplasma 12, 196—220.
- Seifriz, W., 1936: Protoplasm. New York and London.
- Strohmeyer, G., 1935: Beiträge zur experimentellen Zytologie. Planta 24, 470—509.
- Strugger, S., 1930: Beiträge zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekernes. Protoplasma 10, 363—378.
- Tischler, G., 1934: Allgemeine Karyologie. II. Auflage. 1. Hälfte: Der Ruhekern. Berlin.
- Walter, H., 1923: Protoplasma- und Membranquellung bei der Plasmolyse. Jahrb. wiss. Botanik 62, 145—213.
- 1924: Plasmaquellung und Wachstum. Zeitschr. Botanik 16, 352—417.
- Weber, Fr., 1930: Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 9, 106—119.

Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte

Von

Otto Härtel

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

(Eingelangt am 10. Dezember 1950)

Nach Höfler (1947 a, b, 1949 a, b) lassen sich auf Grund der Vitalfluorochromierung „volle“ und „leere“ Zellsäfte unterscheiden. Bei den „vollen“ Zellsäften wird der Farbstoff in Form einer chemischen Verbindung an bestimmte Zellbestandteile als Molekül festgelegt; derartige Zellen erscheinen, mit Akridinorange fluorochromiert, im UV-Licht grün, wobei der Ausfall der Fluorochromierung weitgehend p_H -unabhängig ist. „Leere“ Zellsäfte speichern dagegen den Farbstoff als Ion, sie fluoreszieren nach Behandlung mit Akridinorange bis zu einem p_H von etwa 6,2 bis 6,5 herab kupferrot. Eine Unterscheidung beider Zellsafttypen ist nach Höfler prinzipiell auch mit Diachromen im Hellfeld möglich, so z. B. durch Neutralrotfärbung auf Grund des Farbtones bzw. der verschiedenen Auswaschbarkeit der Färbung mit verdünntem Ammoniak (Höfler 1947 a, b). Auch scheinen sich „volle“ Zellsäfte durch rein blaue Anfärbung mit metachromatischen Farbstoffen auszuzeichnen (z. B. Cresylechtviolett, Höfler und Stiegler 1947, Härtel, Kenda und Weber 1950). Welche Bestandteile des Zellsaftes jedoch für die chemische Bindung des Farbstoffes maßgebend sind, ist noch nicht geklärt, die Fähigkeit hierzu scheint keineswegs auf einen bestimmten Stoff oder eine Stoffgruppe allein beschränkt zu sein. Mit Akridinorange fluorochromierte Zellkerne zeigen eine strenge Lokalisation der Grünfluoreszenz auf die Gerüstsubstanzen, was auf Nukleotide als speichernde Stoffe hinweist (Strugger 1949, Höfler 1949 c); ob auch im Zellsaft chemisch verwandte Stoffe (Ribonukleinsäure, Metachromatin) für eine Speicherung verantwortlich sind, ist ungewiß; der durch Metachromatin verursachte Farbumschlag blauer metachromatischer Farbstoffe nach Rot oder Violett (Dangeard, zit. n. Guilliermond) scheint eher dagegen zu sprechen. Dagegen kann eine rein blaue Tinktion des Zellsaftes durch die Gegenwart von Lipoiden bedingt sein (vgl. Guilliermond, Spek). Der „volle“ Charakter des Zellsaftes der Zwiebel-Außenepidermis könnte demnach sehr wohl mit ihrem Lipoidreichtum zusammenhängen (vgl. Höfler 1947 a). Aber schon saure Reaktion des Zellsaftes allein (z. B. infolge des Gehaltes an Phenolverbindungen, Manganot) kann zu einer rein blauen Anfärbung des Zellsaftes mit dem metachromatischen Farbstoff Cresylblau führen (Guilliermond). Drawert sowie Höfler (1949 c) ziehen gleichfalls organische (Fett-) Säuren und salzartige Bindung des Farbstoffes als Ursache in Erwägung, unter

Hinweis auf den Umstand, daß organische Säuren mit Akridinorange grün fluoreszierende Verbindungen ergeben. Im Zellsaft gelöste Proteine könnten gleichfalls für eine chemische Farbstoffspeicherung in Frage kommen, doch verändern auch sie gleich anderen kolloiden Stoffen den Farbton metachromatischer Farbstoffe von Blau nach Rot (vgl. Guilliermond, Lison). Eiweißstoffe treten innerhalb der Zelle vielfach mit Gerbstoffen zu Additionsverbindungen zusammen, und es wäre durchaus denkbar, daß (wenigstens bestimmte) Gerbstoffe von Säurecharakter ähnliche Verbindungen mit basischen Farbstoffen eingehen und so „volle“ Zellsäfte verursachen könnten, zumal nach Mangel auch Gerbstoffe Cresylblau teils mit violetter, teils aber auch mit blauer (bis blaugrauer) Farbe zu speichern vermögen. Über einige diesbezügliche fluoreszenzoptische Beobachtungen an gerbstoffführenden Zellen im Vergleich mit gerbstofffreien „vollen“ Zellsäften wird im folgenden berichtet.

Die typisch „volle“ Zellsäfte enthaltenden Idioblasten im Mesophyll der Kelch- und Laubblätter von *Verbascum Blattaria* weisen nach Härtel, Kenda und Weber (1950) einige Ähnlichkeiten ihres zellphysiologischen und protoplasmatischen Verhaltens mit den Epidermiszellen von *Monotropa hypopitys* auf. Letztere sind gleichfalls außerordentlich lipoidreich (Biedermann 1920). Mit Akridinorange fluorochromiert, speichern sie den Farbstoff bis unter p_H 3 mit grüner Fluoreszenz; diese wird besonders deutlich, wenn die Zellen entweder nachher plasmolysiert werden oder wenn das Plasmolytikum gleichzeitig mit dem Fluorochrom geboten wird. Die *Monotropa*-Zellen enthalten demnach gleichfalls „volle“ Zellsäfte. Es standen zwar infolge vorgeschrittener Jahreszeit nur unterirdische Sprosse von *Monotropa* zur Verfügung, doch dürfte dies kein ins Gewicht fallender Umstand sein; die Epidermiszellen zeigten lediglich eine etwas geringere Bereitschaft, bei der Plasmolyse die von Biedermann beschriebenen Entmischungsfiguren auszubilden. Die Zellen erscheinen weniger lipoidreich, die Plasmolyse trat glatt ein, ein Umstand, der zugunsten der von Weber ausgesprochenen Deutung der Biedermannschen Befunde hinsichtlich der Verteilung der Lipide in der *Monotropa*-Zelle (kein Fettplasma, sondern distinkte Vakuole) spricht (vgl. Härtel, Kenda und Weber 1950). Gegenüber Osmiumsäure verhielt sich unser Material ähnlich, wie es Biedermann beschrieb. Darüber hinaus traten nach Versetzen der Schnitte mit konzentrierter NaOH + NH₃ (Fettreagens nach Molisch) innerhalb 24 Stunden runde Tropfen, Schollen und nadelförmige Kristalle von Fettseife auf, womit das Vorhandensein von Lipoiden erneut sichergestellt ist. Gerbstoffe u. dgl. konnten nicht nachgewiesen werden, die Plasmalreaktion fiel negativ aus.

Es mußte nun interessant erscheinen, einen anderen Vertreter der Familie der Pirolaceen mit *Monotropa* zu vergleichen. Die Epidermiszellen der Blattunterseite von *Pirola secunda* fallen durch stark lichtbrechenden Inhalt auf (Sammelzeit Anfang November). Bei der Plasmolyse tritt eine ähnliche Vakuolisierung bzw. eine tropfige Entmischung ein; die dabei auftretenden Bilder ähneln sehr denen, die Biedermann für *Monotropa* beschrieben hat und die auch an unserem Material beobachtet werden konn-

ten. Chloroformwasser erzeugt schaumige Struktur im Zellinnern wie bei *Monotropa* (vgl. Biedermann), auch die Schwärzung mit OsO_4 tritt schon in kurzer Zeit ($\frac{1}{2}$ Stunde) mit großer Intensität ein. Bei der Verseifung mit Molischs Reagens dagegen ergeben sich keine Hinweise für das Vorhandensein nennenswerter Mengen von Lipoiden; es treten nur vereinzelt kleine Tröpfchen auf, die zudem keineswegs mit Sicherheit als Fettseifen zu identifizieren sind. Sudan III wird nicht gespeichert, dagegen fielen sämtliche Reaktionen auf Gerbstoffe (FeCl_3 , Kaliumbichromat, Natriumwolframat, Sperlichsche Jodprobe) stark positiv aus; nach Behandlung mit den Fällungsreagentien waren die Zellen mit einem außerordentlich dichten Niederschlag angefüllt. Silbernitrat wird in der Kälte, Fehlingsche Lösung in der Wärme reduziert. *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (Reagens

Tab. 1. Fluoreszenz von *Monotropa hypopitys* und *Pirola secunda*. (Akridinorange 1 : 10 000, 15 Min.)

		<i>Monotropa</i>	<i>Pirola</i>
p_H 2,5	Membran Zellinhalt	hellblau (Zellulose-Eigenfl.) mattgrün +	hell leuchtend goldgelb ++ gelbgrün (einige etwas rötli.)
p_H 3,8	Membran Zellinhalt	Zellulose-Eigenfl. ++ grün	Zellulose-Eigenfl. + — ++ grün
p_H 5,2	Membran Zellinhalt	Zellulose-Eigenfl. +++ grün	wie oben ++ grün
p_H 6,5	Membran Zellinhalt	wie oben, Randpartien gelb bis rötlich +++ grün	wie oben, Randpartien beginnend kupferrot +++ grün

nach Joachimowitz) färbt, wie bereits Fürth (1920) beobachtete, die Epidermiszellen intensiv rot, was auf einen Gehalt an Phloroglukotannoiden (bzw. Katechinen) hinweist. Gleichzeitig tritt mit diesem Reagens eine tropfige Entmischung ein, wobei sich der Zellinhalt in eine stärker rot gefärbte, etwas körnige Phase und in homogene Tropfen von blasserer Farbe scheidet. Diese sind aber nicht lipoider Natur, sondern stellen wohl eine wäßrige Phase dar, offenbar Teile des Zellsaftraumes; die Chloroplasten liegen stets außerhalb der Tropfen. Bei Behandlung der derartig veränderten Zellen mit Osmiumdämpfen beschränkt sich die Schwärzung vornehmlich auf die granulierten Partien, die „Vakuolen“ bleiben wesentlich heller. Nach Wasserzusatz (aber auch z. B. von konz. Glycerin) verschwindet die Scheidung in die beiden Phasen, es tritt Homogenisierung des Zellinhaltes ein, der dann durch die Osmiumsäure mehr oder weniger dunkelgrau verfärbt erscheint.

Bei der Fluorochromierung verhalten sich die Epidermiszellen von *Pirola secunda* genau so wie die „vollen“ Zellsäfte Höflers. In Tab. 1 ist das Verhalten von *Monotropa* und *Pirola* nach Vitalfluorochromierung in Farblösungen von verschiedenem p_H (Phosphatpuffer) gegenübergestellt.

Der Zellinhalt von *Monotropa* nimmt bereits im sauersten Farbbad (p_H 2,5) eine wenn auch noch nicht allzu starke mattgrüne Fluoreszenz an,

die jedoch mit steigendem p_H immer intensiver wird. *Pirola* dagegen speichert den Farbstoff aus dem sauersten Puffer bereits zu wesentlich stärkerer Intensität, ein weiterer Anstieg der Fluoreszenzhelligkeit mit steigendem p_H ist nicht zu beobachten. Diese Zellsäfte sind demnach gleichfalls als „voll“ im Sinne Höflers anzusprechen. Die vor allem in saueren Puffer zu beobachtende wesentlich stärkere Farbstoffspeicherung durch *Pirola* legt es im Zusammenhang mit dem negativen Ausfall der Lipoidreaktion einerseits, dem hohen Gerbstoffgehalt andererseits nahe, bei *Pirola* die Gerbstoffe als Ursache der Farbstoffspeicherung anzusehen.

Der Zusammenhang zwischen Gerbstoffgehalt und Farbstoffspeicherung läßt sich auch noch auf andere Weise bestätigen. Wenn die Festlegung des Farbstoffes durch chemische Bindung an Zellbestandteile erfolgt, muß eine

Tab. 2. *Pirola secunda*. Fluoreszenz mit Alkohol extrahierter Epidermisschnitten nach Fluorochromierung in Akridinorange 1:10000.
 p_H 6,8, 30 Min.

Vorbehandlung (48 Std.)	Gerbstoffgehalt			Fluoreszenz
	FeCl ₃	K ₂ Cr ₂ O ₇	OsO ₄	
Wasser	+++	+++	+++	Membran: leuchtend goldgelb Zellinhalt: ++ gelbgrün — grün
Äthylalkohol 96 %	neg.	neg.	±	Membran: leicht gelblich Zellinhalt: neg.
Benzol.	++	++	++	Membran: leuchtend goldgelb Zellinhalt: hell gelbgrün
Chloroform . . .	++	++	++	Fluoreszenz wie Benzol
Azeton	+	+	+ — ±	Membran: etwas rötlich Zellinhalt: neg. bis schw. grünlich

solche auch an toten Zellen zu beobachten sein (vgl. die Anfärbung der toten Zellkerne bzw. Rotfluoreszenz toten Plasmas, Höfler 1949), sofern die maßgebenden Komponenten in der Zelle verblieben oder bei der Tötung nicht wesentlich verändert worden sind.

Bei Zwiebelschuppen (äußere Epidermen) sowie bei Epidermisschnitten von *Monotropa* bleibt nach der Alkoholbehandlung die Grünfluoreszenz mit Akridinorange völlig aus; den gleichen Effekt hat auch eine Vorbehandlung mit Chloroform, Benzol und Azeton. Der für die Speicherung in Frage kommende Stoff ist also in den genannten Lösungsmitteln löslich, was wiederum auf den Lipoidgehalt der Zellen hinweist. Anders ist das Bild, wenn Epidermisschnitte von *Pirola* mit den Lösungsmitteln behandelt und nachher fluorochromiert werden. Obenstehend ist das Ergebnis dieses Versuches in Form einer Tabelle zusammengestellt, wobei zum Vergleich die Intensität der nach der Vorbehandlung verbliebenen Gerbstoffreaktion aufgenommen ist.

Die Grünfluoreszenz der Zellinhalte entspricht hinsichtlich ihrer Intensität genau dem Grade der Gerbstoffreaktion. Eine ähnliche Parallelität ist übrigens auch nach Fluorochromierung mit Pyronin zu beobachten.

Nach Alkohol- sowie Azetonvorbehandlung verbleiben die Zellen völlig ungefärbt, nach Benzol bzw. Chloroform (wobei die Gerbstoffreaktion positiv bleibt) fluoreszieren sie rot bis rötlichlila. Auf eine vollständige Wiedergabe der p_H -Reihen vorbehandelter Schnitte darf verzichtet werden; als Beispiel ist nachstehend eine solche nach Benzolbehandlung angeführt.

Die Versuche zeigen, daß die Farbstoffspeicherung bei *Pirola* und parallel dazu die „volle“ Zellsaftfluorochromierung auch nach Behandlung der Schnitte mit organischen bzw. Lipoid-Solventien erhalten bleibt. Dabei erkennt man auch, daß die Löslichkeit dieser das Fluorochrom speichernden Stoffe keineswegs mit der an der Zwiebel oder an *Monotropa* beobachteten Löslichkeit übereinstimmt. Lipoide sind in Benzol und Chloroform im allgemeinen leichter löslich als in Alkohol; Lezithine sind in Azeton größtenteils unlöslich, wie dies z. B. bei der Fluorochromierung der Haare und der Idioblasten von *Verbascum Blattaria* gezeigt werden konnte (Härtel, Kenda und Weber 1950 a, b). Der für Lezithine charakteristische Ausfall der Löslichkeitsversuche an den Idioblasten läßt Zutrittsschwierigkeiten der hydrophoben Lösungsmittel wie Benzol oder Chloroform als für den Versuchsausfall nicht allein ausschlaggebend erscheinen. Andererseits sind Gerbstoffe wohl in Alkohol und Azeton löslich, in Chloroform und anderen hydrophoben Solventien dagegen meist schwer- bis unlöslich. Auch dieser Umstand legt einen engen Zusammenhang zwischen der Farbstoffspeicherung und dem Vorhandensein bestimmter Gerbstoffgruppen bei *Pirola* nahe.

In diesem Zusammenhang sei auf die außerordentlich lebhaft gelbe Fluoreszenz der Zellwände der *Pirola*-Epidermis nach Fluorochromierung mit Akridinorange bei p_H 2,5 und ihr Verschwinden mit steigendem p_H hingewiesen; erst bei p_H 5–6 kehrt eine Fluoreszenz, und zwar nunmehr mit rötlicher Farbe, wieder. Eine Membranfluoreszenz unterhalb ihres Entladungspunktes haben bereits Strügger (1940) und Höfler (1947), allerdings nur mit mattgrünlicher bis grüngelber Farbe, beschrieben und als Imbibitionsfärbung gedeutet. Eine derart gleißendgelbe Fluoreszenz, wie sie an unserem Objekt auftritt, ist indes damit kaum zu erklären. Es liegt nahe, hier gleichfalls eine Löslichkeitsspeicherung anzunehmen. Die Fluoreszenz wird durch die Lösungsmittel in ähnlicher Weise modifiziert wie die des Zellsaftes (vgl. Tab. 2). Die Färbung erweist sich ferner gegenüber 0,5 mol. $CaCl_2$ beständig; elektrostatische Speicherung, die schon durch die völlige Entladung der Membran unwahrscheinlich ist, scheidet also aus. Mit Osmiumsäure nehmen die Zellwände allmählich eine graue Tönung an, die nach Alkoholbehandlung (die auch die Membranfluorochromierung weitgehend unterbindet) ausbleibt. Es darf demnach angenommen werden, daß gleichfalls Gerbstoffe, die in die Membran eingelagert sind, das Fluorochrom speichern. Ob das Ausbleiben der gelben Fluoreszenz nach Überschreitung des Entladungspunktes um p_H 3 (Höfler 1947 a, b), also beim Auftreten negativer Aufladung der Zellwand, mit einer Absättigung der Gerbstoffe (die ja Säurecharakter besitzen) in Zusammenhang gebracht werden kann, wurde nicht weiter untersucht.

Eine Möglichkeit muß bei der Diskussion von Gerbstoffen als farbstoffspeichernde Agentien in Betracht gezogen werden: es könnten nicht die Gerbstoffe selbst, sondern Stoffe, die diese begleiten und mit ihrer Bildung in Zusammenhang stehen, etwa organische Säuren u. a., das Fluorochrom

speichern. Dieser Einwand kann einmal damit entkräftet werden, daß die Azidität der Zellsäfte von *Pirola* und *Monotropa* ungefähr in der gleichen Größenordnung liegt (zwischen p_H 3 und 4, bestimmt durch Vitalfärbung mit Indikatoren, vgl. Small 1929); erheblich verschiedene Säuremengen kommen also kaum in Betracht. Zum anderen muß darauf hingewiesen werden, daß bereits bei Färbezeiten von 10–15 Min. einzelne Zellen der Epidermis von *Pirola secunda* einen Stich ins Rötliche annehmen. Verlängert man die Fluorochromierungszeit auf über eine Stunde, so wird eine immer größere Zahl der Zellen mehr oder weniger kupferrot, wobei alle Übergänge von Grün über Gelbgrün, Gelb, Orange zu Rot zu beobachten sind. Nun ist aber eine Speicherung von Akridinorange durch Gerbstoffe

Tab. 3. *Pirola secunda*. Vergleich lebender und benzolextrahierter Epidermisschnitte. (Akridinorange 1 : 10 000, 50 Min.)

Puffer		Lebend	48 Std. benzolextrahiert
p_H 2,3	Membran Zellinhalt	hellgoldgelb stumpfgelbgrün	hellgoldgelb mattgrün
p_H 3,5	Membran Zellinhalt	neg. — schwach gelblich gelbgrün	hellgoldgelb grüngelb
p_H 4,8	Membran Zellinhalt	neg. gelbgrün	neg. gelbgrün, z. T. etwas rötlich
p_H 6,0	Membran Zellinhalt	neg., z. T. etwas rötlich gelbgrün	etwas rötlich seegrün
p_H 7,6	Membran Zellinhalt	matt kupferrot seegrün	matt gelblichrot matt seegrün

zu roter Fluoreszenz bekannt (vgl. Höfler 1949 a), es kommt dabei, ähnlich wie bei Hellfeldfarbstoffen, zur Krümelbildung. Auch die *Pirola*-Zellen speichern Neutralrot zunächst mit violettroter Farbe (nach Höfler charakteristisch für volle Zellsäfte!), wobei es aber bald zur Ausfällung von Farbstoffkrümeln kommt. Brillanteresylblau und Cresylechtviolett fallen sofort körnig-krümelig aus. Gefällter Gerbstoff vermag indes nachträglich keine Farbe mehr aufzunehmen (Analogie zum Verschwinden der Membranfluoreszenz nach Überschreiten des Entladungspunktes? Vgl. oben).

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Farbstoffspeicherung durch Gerbstoffe, die zum Bilde „voller“ Zellsäfte führt, bei *Pirola* einen Sonderfall darstellt, oder ob ähnliches auch bei anderen gerbstoffführenden Zellen gefunden werden kann, bzw. ob sich auch andere „volle“ und zugleich gerbstoffhaltige Zellen finden lassen. Höfler hat unter den einheimischen Orchideen Paradebeispiele für „volle“ Zellsäfte gefunden; die von ihm untersuchten Pflanzen dürften wohl mit Sicherheit als gerbstofffrei anzusprechen sein; auch die Epidermen einer Reihe anderer daraufhin untersuchter Orchideen (*Oncidium*-, *Coelogyne*- und *Paphiopedilum*-Arten sowie *Vanilla planifolia*) erwiesen sich gleichfalls bei „vollen“ Zellsäften als gerbstofffrei. Da diese Zellen aber Osmiumsäure-Schwärzung zeigen,

die nach Azetonbehandlung gleich der Grünfluoreszenz verschwindet, sind vielleicht Lipotide als speichernde Stoffe anzusehen.

Crassulaceen besitzen im Mesophyll unterhalb der Epidermis Gerbstoffidioblasten bzw. gerbstoffführende Zellen. Bei verschiedenen *Echeveria*-Arten (z. B. *E. glauca*, *imbricata* u. a.) fluoreszieren diese Zellen, mit Akridinorange bei p_H ca. 6 behandelt, intensiv seegrün, auch bei p_H 2,5 kommt es zu einer, wenn auch etwas schwächeren, trüb- bis seegrünen Fluoreszenz einzelner Zellen bzw. Zellgruppen. Bei nachheriger Behandlung der gleichen Schnitte mit Gerbstoffreagenzien geben die meisten dieser „acridinogrünenden“ Zellen (Höfler 1947 a) kräftige Gerbstoffreaktion, in den restlichen Zellen zeigt sich eine solche innerhalb etwa 10–12 Min. Auch Saxifragaceen enthalten solche Gerbstoffzellen; diese lassen sich z. B. bei *Saxifraga Cotyledon* im Hellfeld von den übrigen subepidermalen Zellen nicht ohne weiteres unterscheiden. Mit Akridinorange behandelt erweisen sich die Gerbstoffidioblasten (und nur diese!) als typisch „voll“, und zwar unabhängig vom p_H , die Fluoreszenz reicht auch in diesem Falle bis zu p_H 2,5. Bei *Saxifraga Aizoon* (var. *Sturmiana*) liegen die gerbstoffführenden Zellen in parallelen Reihen unterhalb der Epidermis, sie zeigen untereinander zahlreiche Queranastomosen. Genau das gleiche Bild ergibt die Akridinbehandlung; die Gerbstoffzellen fluoreszieren wiederum grün, während die übrigen Zellen einschließlich der Epidermiszellen ungefärbt bleiben. Nebenbei sei vermerkt, daß viele dieser gerbstoffführenden Zellen auch die Plasmal-Reaktion geben; indes darf bei Anwesenheit von so viel Gerbstoff daraus kein Schluß auf Azetalphosphatide gezogen werden. Dagegen fällt auch in diesen Zellen die Reaktion nach Joachimowitz auf Phloroglukotannoide positiv aus; gegenüber *Pirola* besteht nur der Unterschied, daß es zu keiner Entmischung kommt. Die Gerbstoffe, die sich in den „vollen“ Zellsäften der Crassulaceen und Saxifragaceen befinden, gehören demnach in die gleiche Gruppe wie die von *Pirola*. Kontrollproben mittels Vanillin-Salzsäure führen zum gleichen Resultat.

Besonders instruktiv ist das Verhalten von *Aeonium arboreum* (Crassulaceae). In den Blättern dieser Pflanze liegen die gerbstoffführenden Zellen als dickbalkiges Netzwerk unterhalb der Epidermis. Diese Zellen nehmen mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd sowie mit Vanillin-HCl eine tiefdunkelrote Farbe an, sie erweisen sich ferner unter dem Fluoreszenzmikroskop eindeutig als „voll“. Die Schließzellen sowie die zwei bis vier in spiraliger Anordnung sie umgebenden Nebenzellen geben mit dem Aldehydreagens größtenteils gleichfalls eine Rötung, wobei sich jedoch zum Unterschied zu den Mesophyllzellen unter der Einwirkung des Reagens bald eine körnige Trübung des Zellsaftes einstellt. Die übrigen Epidermiszellen bleiben unverändert und ungefärbt, während sie sich mit den üblichen Gerbstoffreagentien als gerbstoffhaltig erweisen. In den meisten Schließzellen sowie deren Nebenzellen sind demnach (vielleicht neben anderen Gerbstoffen) auch Phloroglukotannoide enthalten. Mit Akridinorange fluorochromiert, leuchten diese Zellen in schwach mattgrüner Farbe auf, während die übrigen Epidermiszellen dunkel bleiben! Dies demonstriert augenfällig den

Zusammenhang zwischen positiver Reaktion nach Joachimowitz auf Phloroglukotannoide (resp. Katechine) und „vollem“ Charakter der Zellsäfte; andersgeartete Gerbstoffe vermögen keinen Farbstoff zu speichern. *Spirogyra* enthält reichlich Gerbstoffe, die den Tanninen zuzuzählen sind (vgl. Molisch), Phloroglukotannoide sind nicht nachweisbar; in Übereinstimmung damit erfolgt auch keine Speicherung von Akridinorange zu grüner Fluoreszenz.

Die Blätter von *Camellia japonica* enthalten in ihrem Mesophyll reichlich Gerbstoffe, die, wenigstens zum Teil, kräftige Reaktion mit dem Joachimowitz-Reagens geben (die Gerbstoffe gehören großteils den Katechinen an). Diese Zellen erweisen sich gleichfalls als „voll“. Allerdings ist ihre Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop schwierig, weil sie durch die leuchtend grüne (am Schnitttrand rote) Fluoreszenz der Epidermiszellen überdeckt wird; am besten läßt sie sich an Blattquerschnitten erkennen. Die gleichfalls „volle“ Epidermis erweist sich mit sämtlichen angewendeten Reagenzien als gerbstofffrei; die Speicherung des Farbstoffes muß demnach auf andere Ursachen zurückgehen. Auch weicht der Farbton der Epidermis-Fluoreszenz von der trübmatgrünen Fluoreszenz der Gerbstoffzellen im Mesophyll etwas ab und unterscheidet sich von ihr vor allem durch die wesentlich größere Leuchtkraft. Allerdings läßt sich auch die Epidermis bis zu einem p_H von 2,5 zum gleichen Farbton fluorochromieren, die Fluoreszenz ist auch gegenüber kurzem Aufkochen der Schnitte unter dem Deckglas beständig, bleibt jedoch nach Behandlung der Schnitte mit Alkohol, Chloroform, Benzol und Azeton aus. Auch dies deutet darauf hin, daß in den Epidermiszellen von *Camellia* andere Stoffe als Gerbstoffe das Fluorochrom speichern.

Als „klassische“ Objekte für Phloroglukotannoide gelten die Inklusen, z. B. im Fruchtfleisch von *Ceratonia siliqua*, der Mispel und Bananen sowie in der Rinde von Eichen und anderen Holzgewächsen. In der Eichenrinde leuchten nach Akridinfluorochromierung, unabhängig vom p_H , einzelne Zellreihen und Einzelzellen mit intensiv gelber bis gelbgrüner Farbe auf; genau die gleichen Zellen nehmen in *p*-Dimethylaminobenzaldehyd eine tiefroter Farbe an. Bei längerdauernder Fluorochromierung (1–3 Stunden) geht der Farbton in Orange und schließlich in Kupferrot über; dies muß wohl mit fortdauernder Speicherung und dabei auftretender Polymerisationsmetachromasie (vgl. Strugger 1949 und Höfler 1949b) erklärt werden. Auch die Zellen des Fruchtfleisches der Mispel geben die gleiche Reaktion auf Phloroglukotannoide; Akridinorange wird durch sie zu grau- bis hellgrüner Fluoreszenz gespeichert, wobei Helligkeit und Farbton der Fluoreszenz von Zelle zu Zelle stark wechselt. Zum Unterschiede von den genannten Objekten zeigen die Inklusen der Banane eine deutliche Kontur innerhalb der Zelle bzw. eine Oberflächenskulptur, sie sind also von fester Konsistenz; ähnlich sind auch die Inklusen des Johannisbrotens. In derartigen festen Inklusen tritt eine Grünfluoreszenz mit Akridinorange nur in sehr geringer Intensität auf oder bleibt überhaupt ganz aus. Im Fruchtfleisch der Banane konnten einige Inklusen beobachtet werden, die noch nicht dunkel verfärbt, wenig deutlich konturiert, also noch nicht ganz verfestigt

waren; solche Zellen vermögen das Fluorochrom noch relativ stark zu speichern und fluoreszieren dann deutlich grün.

Die zuletzt angeführten Versuche an extrem gerbstoffhaltigen Zellen bestätigen die Annahme, daß Phloroglukotannoide „volle“ Zellsäfte verursachen können. Allerdings scheint der Zustand, in dem sich diese Stoffe in der Zelle befinden, nicht gleichgültig zu sein. Eine Speicherung ist nach den geschilderten Beobachtungen offenbar nur solange möglich, als die Phloroglukotannoide in diffuser Verteilung, also gelöst, vorliegen. In diesem Zustand zeigen Gerbstoffe Neigung zu Adsorptions- oder Komplexbindungen; ausgefällter oder krümeliger Gerbstoff vermag keinen Farbstoff mehr aufzunehmen. Auf ähnliche Beobachtungen wurde schon hingewiesen. Auch die gegenüber gerbstoffführenden Mesophyllzellen wesentlich schwächere Fluorochromierbarkeit der Schließ- und Nebenzellen von *Aeonium arboreum* kann wohl mit der Neigung der darin enthaltenen Gerbstoffe zur Krümelbildung (z. B. bei Zusatz des Joachimowitz-Reagens) und dem damit möglicherweise verbundenen geringeren Vermögen, mit Akridinorange grün fluoreszierende Additionsverbindungen zu geben, in Zusammenhang gebracht werden.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen von Gerbstoffvorkommen und Vitalfluorochromierung haben ergeben, daß Phloroglukotannoide resp. Katechine (Gerbstoffe, die mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd rote Färbung geben), sofern sie in diffuser bzw. gelöster Form vorliegen, Akridinorange weitgehend p_H -unabhängig mit grüner bis gelbgrüner Fluoreszenz zu speichern vermögen. Phloroglukotannoide dürften deshalb als eine der Ursachen für „volle“ Zellsäfte im Sinne Höflers (p_H -unabhängige Speicherung von molekularem Farbstoff in Form einer chemischen Bindung mit bestimmten Komponenten des Zellsaftes) anzusehen sein.

Literatur

- Biedermann, W., 1920: Der Lipoidgehalt bei *Monotropa hypopitys* und *Orobancha (speciosa)*. Flora 13, 133.
 Dangeard (zit. n. Guilliermond).
 Drawert, H., 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
 Fürth, P., 1920: Zur Biologie und Mikrochemie einiger *Pirola*-Arten. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-natw. Kl., Abt. I, 129, 559.
 Guilliermond, A., 1930: Le vacuome des cellules végétales. Protoplasma 9, 133.
 — 1941: The cytoplasm of the plant cell. Waltham, Mass.
 Härtel, O., G. Kenda und F. Weber, 1950: Myelinfiguren aus Drüsenhaaren von *Verbascum Blattaria*. Protoplasma 39.
 — — 1950: Plasmol-Idioblasten im Mesophyll von *Verbascum Blattaria*. Protoplasma 39.
 Höfler, K., 1947 a: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-natw. Kl., Abt. I, 156, 585.

- 1947 b: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13
- 1949 a: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. *Mikroskopie*, Sonderheft S. 46.
- 1949 b: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biol. gen.* 19, 90.
- 1949 c: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase? *Protoplasma* 39, 62.
- Höfler, K. und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. *Mikroskopie* 2, 250.
- Joachimowitz, M., 1917: zit. n. Molisch. .
- Lison, L., 1935: La signification histochimique de la métachromasie. *C. R. Soc. Biol.* 118, 821.
- Molisch, H., 1921: *Mikrochemie der Pflanze*. 2. Aufl. Jena.
- Paech, K., 1950: *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Springer, Berlin.
- Small, J., 1929: Hydrogen ion concentration in plant cells and tissues. *Protoplasma-Monographien* 2.
- Spek, J., 1945: Eine optische Methode zum Nachweis von Lipoiden in der lebenden Zelle. *Protoplasma* 37, 49.
- Strugger, S., 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jenaische Ztschr. Naturwiss.* 73, 97.
- 1949: *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrologie*. Hannover.
- Weber, F., 1923: Plasmalemma oder Tonoplast? *Protoplasma* 15, 452.

Zur zellphysiologischen Analyse der Blütenbewegungen

Von

Gertrud Mückschitz

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 10 Textabbildungen

(Eingelangt am 5. Dezember 1950)

Durch den Versuch, die Methoden der Zellphysiologie in den Dienst einer Kausalanalyse der Bewegungs- und Wachstumserscheinungen der Pflanzen zu stellen, eröffnet sich dem Zellphysiologen in der Reizphysiologie der Pflanzen ein weites Arbeitsgebiet. Während auf einigen speziellen Gebieten, wie vor allem den Erscheinungen der Lichtturgor- und Seismoreaktionen in den Blattgelenken einiger Pflanzen, eingehende zellphysiologische Untersuchungen vorliegen, sind bis jetzt jene Bewegungserscheinungen, die in der Blütenregion vieler Pflanzen auftreten und als Thermo-, Photo- und Seismoreaktionen anzusehen sind, nur wenig vom zellphysiologischen Standpunkt aus untersucht worden. Unter den Blütenbewegungen kommen außerdem den sogenannten Entfaltungsbewegungen und jenen rhythmischen Bewegungen, die als nyktinastische oder Schlafbewegungen bezeichnet werden, eine besondere Bedeutung zu. Bei vielen dieser Erscheinungen kann die Frage, ob die Bewegungen als aitiogen oder autonom anzusehen sind, noch nicht als vollkommen geklärt betrachtet werden. Es muß vielmehr bei vielen dieser Vorgänge auch mit dem Mitwirken endogener Rhythmen gerechnet werden. Zur Erklärung des Mechanismus der Blütenbewegungen, sei es, daß sie auf Wachstumsvorgänge zurückzuführen sind, sei es, daß sie auf Turgoränderungen beruhen, werden im allgemeinen physiologische Unterschiede zwischen Blattober- und -unterseite angenommen.

Vom Standpunkt der protoplasmatischen Pflanzenanatomie, deren Ziel es ja ist, die einzelnen Zell- und Gewebetypen auf Grund der Eigenschaften ihrer lebenden Protoplasten genau zu kennzeichnen, erscheint daher eine eingehende Untersuchung aller jener Blattorgane, an denen sich Bewegungserscheinungen beobachten lassen, dringend geboten.

Zu diesen im größeren Ausmaß geplanten Untersuchungen stellen die vorliegenden Versuche einen Auftakt dar; sie beschränken sich auf Beobachtungen an *Crocus vernus*, *Tulipa Gesneriana*, *Convolvulus arvensis*, *Gentiana Sturmi* und *asclepiadea* und setzen sich die Beantwortung folgender Fragen zum Ziel:

1. Von welcher Art sind die Longitudinalgradienten in Corollblättern?

2. Von welcher Beschaffenheit sind die Unterschiede zwischen Blattober- und -unterseite der Corollblätter?

3. Welche zellphysiologischen Veränderungen gehen mit den Öffnungs- und Schließbewegungen der Blüten Hand in Hand?

4. Welchen Einfluß hat das Alter der Blüten auf diese Veränderungen?

Thermonastien

I. Versuche mit *Crocus vernus*

Objekt: Pfeffer (1873) hat im Sinn der klassischen Pflanzenanatomie den Bau der Blütenblätter von *Crocus* näher beschrieben. Bezüglich des Bewegungsvorganges konnte er feststellen, daß die Zone der größten Bewegung in das untere Viertel oder Sechstel des Perigonzipfels fällt. Neuere Beobachtungen über die Öffnungs- und Schließbewegungen der *Crocus*-Blüten finden sich vor allem bei Böhner (1933).

Bei den zu den vorliegenden Versuchen verwendeten Pflanzen, einer violett blühenden Form von *Crocus vernus*, ließ sich schon makroskopisch ein deutlicher Unterschied zwischen der Außen- und Innenepidermis vor allem im Bereich der Bewegungszone feststellen, da die Außenepidermis gerade im Bereich dieser Zone eine stark ausgesprochene Anthozyanfärbung aufweist, während die Innenepidermis vollkommen farblos ist. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß auf der Innenepidermis im Bereich der Bewegungszone ein kleinzelliges Meristem liegt, während die Außenepidermis in diesem Bereich kein Meristem aufweist. Für die Blattober- bzw. -unterseite ergab sich bei der Durchführung der Versuche daher eine Gliederung in folgende drei Zonen

Innenepidermis	Außenepidermis
1. Bewegungszone	1. Bewegungszone =
a) meristematische Zone	Streckungszone
b) Streckungszone	2. Mittelzone
2. Mittelzone	3. Spitzenzone
3. Spitzenzone	

Methode: Wenn es bei den zellphysiologischen Untersuchungen galt, das Vorhandensein und den Verlauf von plasmatischen Gradienten innerhalb der Blattlamina bzw. Unterschiede zwischen Blattober- und -unterseite nachzuweisen, wurden halbierte Perigonblätter verwendet. Wird die Durchtrennung eines Perigonblattes mit einer Rasierklinge durchgeführt, so erhält man zwei Gewebepartien, die sich für zellphysiologische Untersuchungen der Epidermiszellen sehr eignen, da unterhalb der Epidermis genügend subepidermale Schichten liegen, um den Wundreiz auszuschalten, andererseits das Eindringen der verschiedenen Versuchslösungen in die Interzellularen auf keine besonderen Schwierigkeiten stößt, wenn die Schnitte entlüftet werden. Bei den Versuchen, bei denen das Augenmerk vor allem auf die Veränderung innerhalb der Zellen der Bewegungszone während des Bewegungsvorganges gerichtet war, wurden Flächenschnitte aus dem ent-

sprechenden Bereich der Blattlamina verwendet. Der Bewegungsvorgang selbst wurde in einfacher Weise durch Temperaturerhöhung bzw. -erniedrigung ausgelöst, wobei bei den Versuchen mit *Crocus*, dessen Blütezeit ja in das erste Frühjahr fällt, meistens die Temperaturdifferenz genügte, die zwischen dem geheizten Zimmer und der Temperatur zwischen den beiden Scheiben eines nordseitigen Fensters bestand.

Versuche: Vorversuche über die Veränderungen innerhalb der Zellen der Bewegungszone bei dem Öffnungs- und Schließvorgang der Blüten zeigten innerhalb der meristematischen Zone der Innenepidermis klare Unter-

schiede in der Gestalt der Zellen, die für eine deutliche Streckung der Zellen der apikalen Zellreihen der Bewegungszone sprechen (Abb. 1) und vermuten lassen, daß in dieser Gewebepartie der aktivste Teil des Bewegungsvorganges zu suchen ist.

Plasmolyseform: Die Plasmolyseform der einzelnen Zellen wurde in Traubenzucker-, KNO_3 - und CaCl_2 -Lösungen in mittleren hypertonischen Konzentrationen untersucht. Dabei ließ sich folgendes feststellen: In den Perigonblättern lassen sich mit Hilfe der Plasmolyseform Longitudinalgradienten nachweisen, und zwar in der Form, daß die Zellen der Basis im allgemeinen konvexe Plasmolyseformen zeigen, die Zellen der Streckungszone jedoch konkave Umrisse ihrer Protoplasten besitzen, während die Zellen der Spitzenzone wieder konvex plasmolysieren, wobei die Protoplasten die Neigung zum Zerfall in Teilstücke aufweisen. Diese Ergebnisse stehen in vollem Einklang mit den Ergebnissen von Strugger (1955) über die Plasmolyseform von Zellen in verschiedenen Wachstumsstadien.

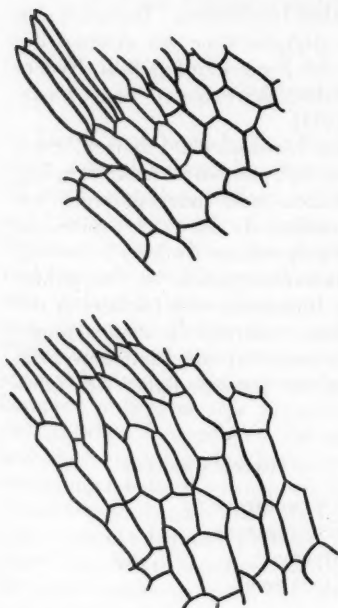


Abb. 1. *Crocus vernus*, meristematische Gewebe des Perigonzipfels.
Oben: geschlossene Blüte.
Unten: offene Blüte.

Diese Gradienten treten mit größerer Deutlichkeit auf der Innenseite der Blätter in Erscheinung, was sich als eine Folge der oben beschriebenen Unterschiede in der Ausbildung der einzelnen Zonen erklären läßt.

Die genauere Analyse der Veränderungen der Plasmolyseform bei dem Öffnungs- und dem Schließvorgang der Blüten, die in Serienversuchen mit Blüten verschiedener Öffnungsweite durchgeführt wurde und bei der in erster Linie die Zellen der Bewegungszone berücksichtigt wurden, brachte die folgenden Ergebnisse:

Bei offenen Blüten zeigen die Zellen der Bewegungszone der Innenepidermis Krampfplasmolyse, während die entsprechenden Zellen der Außenepidermis konvexe Plasmolyseform besitzen. Bei geschlossenen Blüten finden sich jedoch deutlicher ausgesprochene Formen von Krampfplasmolyse in den Zellen der Außenepidermis (Abb. 2). Diese Ergebnisse über die Plasmolyseform fügen sich zwanglos in die Auffassung ein, daß es sich bei den thermonastischen Bewegungen der *Crocus*-Blüte um abwechselndes Streckungswachstum auf den beiden antagonistischen Seiten der Blütenblätter handelt.

Wie weitere Versuche an verschieden alten Blüten zeigen konnten, werden diese Veränderungen in der Ausbildung der Plasmolyseform während des Ablaufes der thermonastischen Bewegungen jedoch überdeckt von den Veränderungen, die mit dem natürlichen Ablauf des Entwicklungsprozesses der Blüten verbunden sind. Bei jungen Blüten besteht eine stärkere Tendenz zur Ausbildung von konvexen Plasmolyseformen, während bei Blüten, die ihre Funktionshöhe erreicht haben, die Neigung zu konkaven Plasmolyseformen im allgemeinen vorherrscht. Die Epidermiszellen alter Blütenblätter sind durch das Bestreben zur Bildung von konvexen Plasmolyseformen mit Zerfall in Teilprotoplasten gekennzeichnet. In der Deutlichkeit, mit der diese durch den natürlichen Entwicklungsgang bedingten Veränderungen auftreten, lassen sich jedoch Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis nachweisen. Während die Außenepidermis diese im Entwicklungsgang liegenden Unterschiede klarer hervortreten läßt, spiegelt die Innenepidermis, die den aktiveren Teil bei den Blütenbewegungen darstellt,

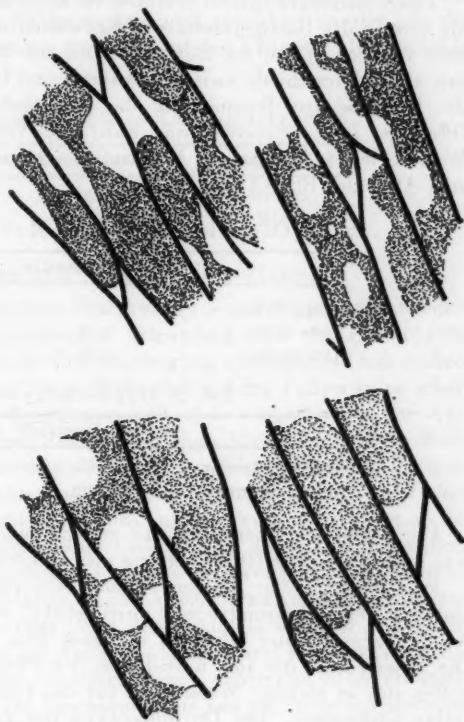


Abb. 2. *Crocus vernus*: Reife Blüte in 1,2 mol. Traubenzucker.

Oben: Geschlossene Blüte, links: Innenepidermis, rechts: Außenepidermis.

Unten: Offene Blüte, links: Innenepidermis, rechts: Außenepidermis.

die durch den Öffnungszustand der Blüten bedingten Veränderungen deutlicher wider, während die von dem natürlichen Entwicklungsvorgang verursachten Erscheinungen mehr in den Hintergrund treten.

Osmotischer Wert: Der osmotische Wert wurde nach der Methode der Grenzplasmolyse in Traubenzuckerlösungen ermittelt.

Longitudinalgradienten konnten in allen Blüten sowohl in der Außen- als auch in der Innenepidermis nachgewiesen werden. Der osmotische Wert fällt von der Spitze zur Basis etwa um 0,1 Mol. Im allgemeinen ergaben sich auch Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis (Tab. 1). Wie die Versuche zur Bestimmung des osmotischen Wertes zeigten, ist der Öffnungs- bzw. Schließvorgang nicht von Veränderungen im osmotischen Wert begleitet. Eine starke Abhängigkeit zeigte der osmotische Wert jedoch vom Alter der Blüte (Tab. 1).

Tab. 1. Osmotischer Wert in Mol Traubenzucker.

	Außenepidermis	Innenepidermis
Junge Blüte . .	0,8	0,75
Reife Blüte . .	0,75	0,70
Alte Blüte . .	0,60	0,55

Tab. 2. Deplasmolysezeit.

	in 1 mol. Harnstoff	in 1 mol. Glycerin
Außenepidermis	20 Min.	15 Min.
Innenepidermis	30 Min.	22 Min.

Der osmotische Wert fällt mit zunehmendem Alter der Blüte deutlich, was auch Bancher (1938) für *Iris* und *Gladiolus* feststellen konnte.

Permeabilität: Zu den Permeabilitätsversuchen, die mit Hilfe der Methode der Deplasmolysezeit durchgeführt wurden, wurden als Plasmolytika Harnstoff und Glycerin in 1 mol. bzw. 1,5 mol. Lösung verwendet. Die Gradienten, die sich hinsichtlich der Plasmolyseform ergeben hatten, ließen sich in gleicher Weise auch für die Permeabilitätseigenschaften der Zellen nachweisen. Die Durchlässigkeit der Zellen nimmt von der Spitze zur Basis allmählich ab; eine besonders geringe Durchlässigkeit für die genannten Plasmolytika zeigten die Zellen der meristematischen Zone der Innenepidermis. Deutlich waren auch die Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis (Tab. 2). In der Tabelle sind die für die Zellen der Bewegungszone voll entwickelter Blüten gefundenen Werte angegeben; doch wurden auch für die übrigen Zonen der Blattlamina entsprechende Unterschiede zwischen den Zellen der Außen- und der Innenepidermis gefunden. Bei Versuchen mit gleich alten Blüten in verschiedenen Öffnungsstadien zeigte es sich, daß mit den thermonastischen Bewegungen keine Veränderung in den Permeabilitätseigenschaften der Zellen verbunden ist.

Einen um so deutlicheren Einfluß besitzt jedoch auch bei den Blütenblättern von *Crocus* das Alter auf die Durchlässigkeitseigenschaften der Zellen (Marklund 1936). In Tab. 3 sind die für eine 1,5 mol. Glycerinlösung erhaltenen Werte angegeben.

Beim Übergang vom Knospenzustand zur reifen Blüte werden die Permeabilitätsunterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis erst allmählich herausgebildet. Mit fortschreitender Entwicklung nimmt im allgemeinen die Durchlässigkeit des Plasmas fortgesetzt zu. Versuche mit ganz alten Blüten zeigten eine rapide Abnahme der Durchlässigkeit sowohl für Harnstoff als auch für Glyzerin in allen Zonen der Blattlamina. Auf die Wiedergabe von bestimmten Zahlenwerten muß verzichtet werden, da die Versuche bei der kurzen Blütezeit der verwendeten Pflanzen nicht beliebig oft wiederholt werden konnten.

Tab. 3. Deplasmolysezeit in 1,5 mol. Glyzerin.

	Außenepidermis	Innenepidermis
Knospe . . .	30—35 Min.	30—35 Min.
Reife Blüte . .	20 Min.	30 Min.

II. Versuche mit *Tulipa Gesneriana*

Objekt: Die thermonastischen Bewegungen von *Tulipa* waren wiederholt Gegenstand von Untersuchungen (Bünning 1929, Märkert 1931, Böhner 1933, 1934). Die Art der Blütenbewegung unterscheidet sich makroskopisch dadurch von der der *Crocus*-Blüte, daß sich bei *Tulipa* keine scharf abgegrenzte Bewegungszone bestimmen läßt, daß vielmehr von der Auswärts- und Einwärtskrümmung das ganze Perigonblatt erfaßt wird. Während bei *Crocus* bei der mikroskopischen Untersuchung die beiden Perigonseiten Unterschiede in der Zonierung erkennen lassen, findet sich bei *Tulipa* sowohl auf der Perigonaußenseite als auch auf der Perigoninnenseite an der Basis ein kleinzelliges meristematisches Gewebe. An dieses Gewebe schließt sich an beiden Seiten gleichlaufend eine breite Streckungszone an, die etwa das erste Viertel des Perigonblattes erfaßt. Diese Streckungszone geht dann allmählich in die Dauerzone über. Was den anatomischen Bau der beiden Epidermen anlangt, so besitzt die Außenepidermis kurze breite und mosaikartig ineinandergefügte Zellen, zwischen denen zahlreiche Spaltöffnungen eingeschaltet sind, während die Innenepidermis aus schmalen langgestreckten, parallellaufenden Zellen besteht.

Methode: Da sich bei *Tulipa* keine besonders ausgeprägte Bewegungszone nachweisen läßt, wurden bei den zellphysiologischen Untersuchungen stets die ganzen Perigonblätter untersucht. Es hat sich dabei als günstig erwiesen, das Blütenblatt zu halbieren und von der einen Hälfte die Innenepidermis und von der anderen Hälfte die Außenepidermis mit Hilfe einer Pinzette abzuziehen. Zu den Versuchen wurden dann stets die mit dem Mesophyllgewebe in Verbindung gebliebenen Epidermen herangezogen. Die Öffnungs- und Schließbewegung wurde bei *Tulipa* in ähnlicher Weise wie bei *Crocus* durch Temperaturänderungen hervorgerufen.

Plasmolyseform: Bei Plasmolyse in 1 mol. Traubenzuckerlösung ließen sich, was die Plasmolysezeit betrifft, deutliche Unterschiede in den einzelnen Zonen der Blattlamina feststellen. Während die Spitzenzone nach ungefähr 10 Minuten das Stadium der perfekten Plasmolyse erreicht

hat, beanspruchen die Zellen der Mittel- bzw. Basalzone 20 bzw. 30 Minuten zur Erreichung dieses Zustandes.

Unterschiede zwischen Außen- und Innenseite ließen sich bei geschlossenen Blüten nicht nachweisen, um so deutlicher waren diese Unterschiede bei geöffneter Blüte. Während bei offenen Blüten in den Zellen der Außenepidermis nach relativ kurzer Zeit (etwa 20 Minuten) in sämtlichen Zonen das Stadium der perfekten Plasmolyse erreicht wird, beanspruchen die Zellen der Innenepidermis eine weit längere Zeit dazu. 30–45 Minuten nach dem Einlegen in das Plasmolytikum zeigen die Zellen der Mittel- und Spitzenzone der Innenepidermis konvexe Plasmolyse, während die Zellen

Tab. 4. Osmotischer Wert in Traubenzucker.

Streckungszone	Innenepidermis	0,62 Mol
	Außenepidermis	0,66 Mol

Tab. 5. Deplasmolysezeit in 1 mol. Harnstoff.

Innenseite . .	114 Min.
Außenseite . .	136 Min.

Tab. 6. Deplasmolysezeit in 1 mol. Harnstoff.

Spitze	100–90 Min.
Mittelzone . .	114–136 Min.
Basis	90–110 Min.

der Basalzone zu dieser Zeit noch stark konvexe Umriss ihrer Protoplasten aufweisen. Diese Ergebnisse sprechen für die besondere Aktivität der Basalzone der Innenepidermis, deren Streckungswachstum zur Öffnungsbewegung führt.

Osmotischer Wert: Auch bei *Tulipa* wurde der osmotische Wert mit Hilfe der Methode der Grenzplasmolyse in Traubenzuckerlösung bestimmt. Bezüglich des osmotischen Wertes ergaben sich schwach ausgeprägte Longitudinalgradienten. Zwischen Innen- und Außenseite bestehen nur geringe Unterschiede im osmotischen Wert; es ließ sich ein etwas höherer osmotischer Wert für die Außenepidermis feststellen (Tab. 4). Bei der Öffnungs- und Schließbewegung ließen sich keine Veränderungen im osmotischen Wert feststellen.

Permeabilität: Die Methode und die verwendeten Plasmolytika waren dieselben wie bei den Permeabilitätsversuchen mit *Crocus*. Die Permeabilitätsuntersuchungen an *Tulipa* ließen im Vergleich mit den Ergebnissen bei *Crocus* geringe Permeabilitätsdifferenzen zwischen Innen- und Außenseite der Blütenblätter feststellen. Obwohl sich die einzelnen Blüten hinsichtlich der Deplasmolysezeit sehr verschieden verhielten, wies doch stets die Innenseite eine raschere Permeation auf als die Außenseite (Tab. 5). Was die Longitudinalgradienten innerhalb der Blattlamina betrifft, so ließ sich in zahlreichen Versuchen ein deutlicher Unterschied zwischen

Spitze, Mittelzone und Basalzone nachweisen (Tab. 6). Orientierende Versuche mit Glycerin zeigten, daß die Epidermiszellen von *Tulipa* besser für Glycerin als für Harnstoff durchlässig sind.

Resistenz: Zur Aufdeckung zellphysiologischer Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen wurden auch Resistenzversuche durchgeführt, die sich vorläufig nur auf die Verhältnisse bei offenen Blüten beschränkten. Zu diesen Untersuchungen wurden die Perigonblätter in hypotonische Lösungen (0,1 und 0,05 mol.) von Harnstoff, Mangansulfat und KNO_3 eingelegt und nach 24 Stunden das Verhalten der einzelnen Zellen bei Plasmolyse verfolgt. Tab. 7 bringt die Ergebnisse:

Tabelle 7.

	Harnstoff		Mangansulfat		Kaliumnitrat	
	0,1 mol.	0,05 mol.	0,1 mol.	0,05 mol.	0,1 mol.	0,05 mol.
Mesophyll . .	abgest.	lebend, aber schw. geschäd.	abgest.	abgest.	abgest.	abgest.
Außenepidermis	geringe Schädigung	geringe Schädigung	stark gesch. vielfach abgest.	fast alle Zellen abgest. Meristem ger. Schäd.	abgest.	stark geschädigt
Innenepidermis	geringe Schädigung	geringe Schädigung	geringe Schädigung	normales Aussehen	abgest.	stark geschädigt

Vom Standpunkt der protoplasmatischen Pflanzenanatomie aus ist die für die verwendeten Stoffe nachgewiesene geringe Resistenz der Mesophyllzellen bemerkenswert. Was die Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis anlangt, so ergab sich in den Resistenzeigenschaften in MnSO_4 eine wesentlich größere Resistenz für die Zellen der Innenepidermis als für die Zellen der Außenepidermis. Was die Longitudinalgradienten betrifft, so ließen sich auch für die Resistenzeigenschaften Unterschiede zwischen der basalen meristematischen Zone, die die höchste Resistenz besitzt, der Mittelzone und der Spitzenzone nachweisen.

Entfaltungsbewegungen

Versuche mit *Convolvulus arvensis*

Schon Dutrochet (1837) hat dem eigenartigen Entfaltungsmechanismus der Convolvulaceen-Blumenkrone seine Aufmerksamkeit zugewandt. Goebel (1924) gibt eine ausführliche Beschreibung der Convolvulaceenblüte, an der sich fünf derber gebaute, meist auch durch die Färbung hervortretende, den mittleren Teilen der verwachsenen Blumenkrone entsprechende Längsstreifen unterscheiden lassen, zwischen denen die zarter gebauten Gewebeteile, die die Hauptmasse der Blumenkrone bilden, gleichsam eingefaltet sind. Goebel ist der Meinung, daß die Entfaltung durch eine Turgorsteigerung auf der Oberseite, die Schließung der Blüte durch Turgorverminderung hervorgerufen wird. Schumacher (1931) vertritt die

Ansicht, daß der rasche Verschluß der Convolvulaceenblüte durch intensive Eiweißspaltung in den Protoplasten der Blütenblattzellen hervorgerufen wird, und Weber (1932) weist darauf hin, daß es sich dabei um einen nur nach wenigen Stunden zählenden rapiden Verlauf einer Nekrobiose handeln dürfte, deren genauere Untersuchung mit Hilfe der Methoden der Protoplasmaforschung von großem Interesse wäre.

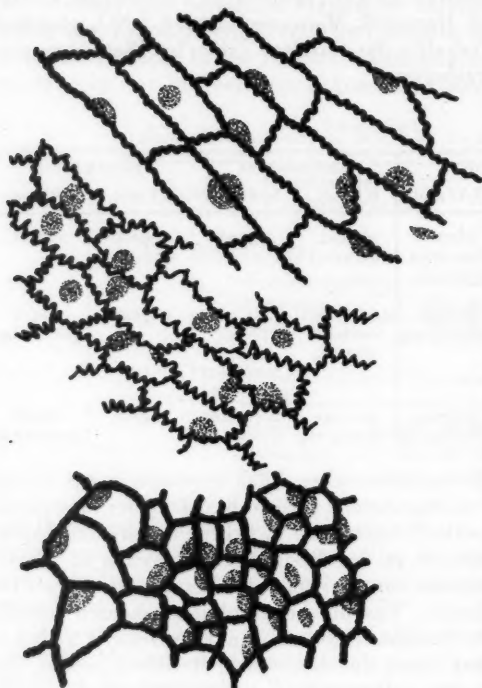


Abb. 3. *Convolvulus arvensis*: I. Knospe.
Oben: Außenepidermis, Längsstreifen.
Mitte: Außenepidermis, Zwischengewebe.
Unten: Innenepidermis.

Die anatomische Voruntersuchung der *Convolvulus*-Blüte ließ vor allem eine genaue Beachtung der folgenden drei Teile der Blüte als wichtig erscheinen: 1. Basis, 2. Längsstreifen, 3. das Zwischengewebe.

Während die Innenepidermis im allgemeinen einen ziemlich einheitlichen Aufbau aus papillösen Zellen mit polygonaler Grundfläche besitzt, unterscheidet sich die Außenepidermis im Bereich der Längsstreifen und des Zwischengewebes stark voneinander. In den Längsstreifen besteht die Außenepidermis aus langgestreckten Zellen mit derben gebuchten Membranen, im Zwischengewebe jedoch aus stark gewinkelten Zellen mit Membranfortsätzen.

Für diese drei Gewebepartien, die Außenepidermis der Längsstreifen

bzw. die Außenepidermis des Zwischengewebes einerseits und die Zellen der Innenepidermis andererseits wurden für drei charakteristische Stadien der Blütenentwicklung, nämlich für das Knospenstadium, das Stadium der maximalen Öffnung der Blüte und schließlich den Zustand der verwelkten, geschlossenen Blüte die Größe der Zellen und die Kernform genau festgestellt. Wie aus Abb. 3, 4, 5 ersichtlich, läßt sich dabei mit fortschreitender Entwicklung eine fortgesetzte Zellstreckung in Verbindung mit einer Abnahme der Wandstärke verfolgen. Der Schließvorgang ist durch einen deutlichen Verfall des Zellkernes charakterisiert.

Plasmolyseform: Zur Untersuchung der Plasmolyseform, die teils in einer 2 mol. Traubenzuckerlösung, teils in entsprechenden hypertoni- schen Lösungen anderer Plasmolytika geprüft wurde, wurden Reihen- versuche für die drei Entwicklungsstadien der Blüte: Knospe — offene Blüte — sekundär geschlossene Blüte, durchgeführt, wobei das Verhalten der Epidermiszellen, und zwar der Basis, der Längsstreifen und des Zwi- schengewebes, untersucht wurde. Die Ergebnisse sind aus Abb. 6, 7, 8 zu entnehmen. Für das Knospenstadium sind durchwegs konvexe Plas- molyseformen charakteri- stisch. Mit dem Öffnungs- vorgang gehen in gewis- sen Gewebepartien, so in den Basiszellen der Au- ßen- und Innenepidermis, deutlich krampfartige Plasmolyseformen Hand in Hand. In den meisten Zellen fällt ein starker Unterschied im Plasmolysegrad im Vergleich mit den Zellen des Knospen- stadiums auf. Der Ver- schluß der Blüte ist durch das Auftreten krampf- artiger bis eckiger Plas- molyseformen und einer neuerlichen Zunahme des Plasmolysegrades ge- kennzeichnet. Diese Be- obachtungen einerseits über die Plasmolyseform, andererseits den Plasmolysegrad sprechen dafür,



Abb. 4. *Convolvulus arvensis*: II. Offene Blüte.
Oben: Außenepidermis, Längsstreifen.
Mitte: Außenepidermis, Zwischengewebe.
Unten: Innenepidermis.

daß bei dem Öffnungsvorgang eine Viskositätserhöhung des Plasmas beson- ders an der Innenseite und ein Steigen des osmotischen Wertes auftritt, während der Schließvorgang mit nekrobiotischen Veränderungen des Plas- mas (Viskositätszunahme nach Reuter 1937) und einer Abnahme des os- motischen Wertes verbunden ist.

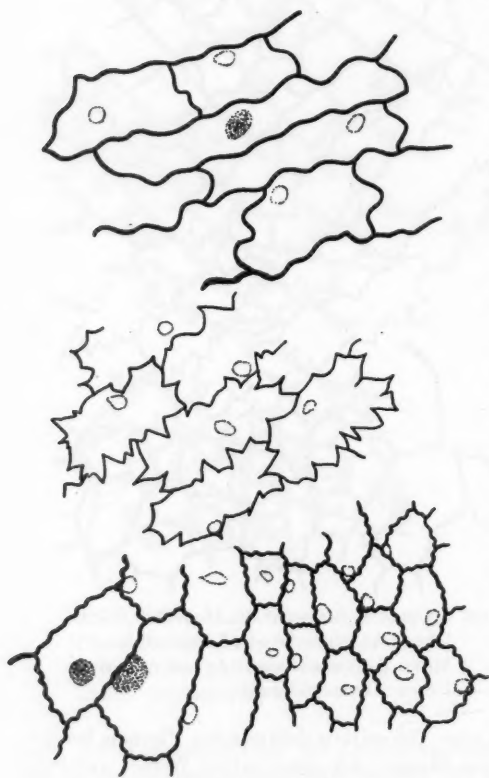
Osmotischer Wert: Die Feststellung des osmotischen Wertes er- schien daher im Fall von *Convolvulus* besonders wichtig. In der Tab. 8 sind die Werte für Traubenzucker angegeben (Tab. 8).

Permeabilität: Die Durchlässigkeitseigenschaften der Zellen wurden

für Harnstoff und Glycerin in verschieden stark konzentrierten Lösungen durch Bestimmung der Deplasmolysezeit geprüft (Tab. 9).

Tabelle 8.

	Knospe	Offene Blüte	Sek. geschlossene Blüte
Innenepidermis	1—1,12 mol.	1,2—1,42 mol.	0,75—0,85 mol.
Außenepidermis	1 mol.	1—1,12 mol.	0,85—1 mol.

Abb. 5. *Convolvulus arvensis*: III. Verwelkte Blüte.

Oben: Außenepidermis, Längsstreifen.

Mitte: Außenepidermis, Zwischengewebe.

Unten: Innenepidermis.

Unterschiede zwischen Innen- und Außenepidermis konnten nicht aufgefunden werden.

Aus der Tabelle geht einerseits hervor, daß die Durchlässigkeit des Plasmas mit dem Öffnungs- und den daran anschließenden Schließvorgang, d. h. mit zunehmendem Alter der Blüte stark abnimmt, andererseits ergaben sich wesentliche Unterschiede zwischen Innen- und Außenepidermis der Blütenblätter. Es ließ sich feststellen, daß die Zellen der Innenepidermis besser für Harnstoff, die der Außenepidermis besser für Glycerin durchlässig sind.

Resistenz: Die Resistenzversuche, die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen aufdecken sollten, beschränkten sich auf die Zellen einer offenen Blüte und wurden in genau derselben Weise wie bei *Tulipa* durchgeführt. Als Ergebnis der Resistenzversuche ließ sich feststellen, daß das Absterben der Zellen von der Basis zur Spitze fortschreitet und daß die Zellen der Längsstreifen resistenter sind als die Zellen des Zwischengewebes.

Seismonastien

I. Versuche mit *Gentiana Sturmiana*

Nach den Angaben in der Literatur wird für *Gentianaceen*blüten neben seismischer auch thermische Reizbarkeit angenommen (Weber 1924, Claus 1926). Die vorliegenden Versuche mit *Gentiana Sturmiana* wurden in den Sommermonaten 1948 und 1949 im Freiland in der Umgebung von Aussee durchgeführt. Dabei ließ sich die hohe Empfindlichkeit der Blüten gegen geringfügige Witterungs- und Temperaturänderungen immer wieder beobachten. Die anatomische Voruntersuchung legte für die zellphysiologischen Untersuchungen eine genaue Beobachtung von drei Gewebepartien nahe, nämlich 1. der Außenepidermis, 2. der Innenepidermis und 3. des Verbindungsstückes zwischen Bartschuppe und Corollzipfel. Höfler und Stiegler (1930) haben *Gentiana Sturmiana* als

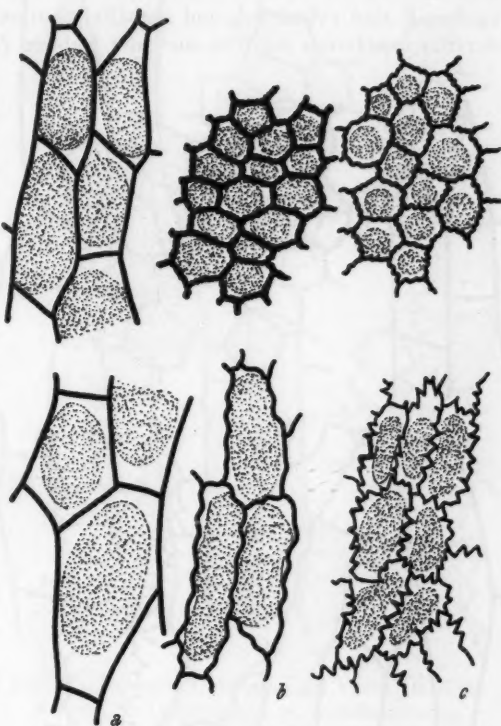


Abb. 6. *Convolvulus arvensis*: I. Knospe.
a Basis, b Längsstreifen, c Zwischengewebe.
Oben: Innenepidermis. Unten: Außenepidermis.

Tabelle 9.

		Harnstoff			Glyzerin	
		2 mol.	2,5 mol.	3 mol.	2,5 mol.	3 mol.
Knospe	Innenepidermis	45 Min.	60 Min.	75 Min.	90 Min.	135 Min.
	Außenepidermis	105 Min.	120 Min.	150 Min.	60 Min.	70 Min.
Offene Blüte	Innenepidermis	60 Min.	80 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.
	Außenepidermis	120 Min.	180 Min.	210 Min.	60 Min.	70 Min.
Sek. geschlossene Blüte	Innenepidermis	∞	∞	∞	∞	∞
	Außenepidermis	∞	∞	∞	∞	∞

Objekt für vergleichende Permeabilitätsstudien gewählt und eine vorteilhafte Präparationsmethode beschrieben, die auch bei den vorliegenden Versuchen Verwendung fand. Die mikroskopische Beobachtung zeigte bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen. Die Zellen der Außenepidermis sind zylindrisch und enthalten Anthocyan, während die Zellen der Innenepidermis papillös sind und farblose Zellsäfte besitzen. Als In-

haltsstoffe der Zellen fallen vor allem Öltropfen auf, die oft schaumartig dem Kern anliegen. Der Zellkern besitzt in den Zellen der Außenepidermis im allgemeinen rundliche Formen und liegt meist in der Mitte der Zelle; in den Zellen der Innenepidermis ist er meist spindelförmig und einer Längswand genähert.

Plasmolyseform:
Die Untersuchung der Plasmolyseform in einer 1 mol. Traubenzuckerlösung brachte für junge geschlossene Blüten folgende Ergebnisse:

1. Außenepidermis:

Die Zellen der Außenepidermis der Corollröhre zeigen im allgemeinen konvexe bis höchstens eckige Plasmolyseformen (Abb. 9). Die Zellen der Bewegungszone dagegen weisen ausgesprochen krampfartige Umriss ihrer Protoplasten auf.

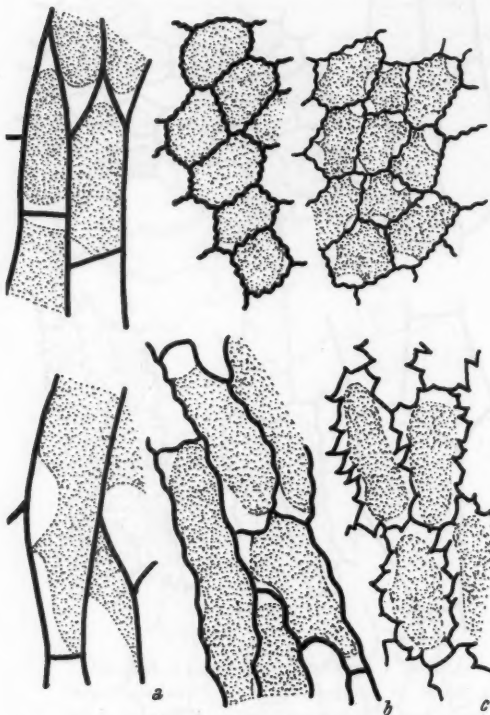
Abb. 7. *Convolvulus arvensis*: II. Offene Blüte.
a Basis, b Längsstreifen, c Zwischengewebe.

Oben: Innenepidermis.

Unten: Außenepidermis.

2. Innenepidermis: Die Zellen der Innenepidermis lassen keine deutlich ausgeprägte Zonierung in der Ausbildung ihrer Plasmolyseform erkennen.

3. Verbindungsstück zwischen Bartschuppe und Corollzipfel: In diesem Gewebeteil, der den aktiven Teil bei der Blütenbewegung darstellt, lassen sich deutliche Unterschiede in der Plasmolyseform zwischen geschlossenen und offenen Blüten nachweisen. Während bei geschlossenen Blüten durch-



wegs konvexe Formen vorliegen, zeigen bei offenen Blüten die Zellen dieser Zone krampfartige Umrisse ihrer Protoplasten (Abb. 10).

Durch Untersuchungen an verschiedenen alten Blüten ließ sich zeigen, daß diese Unterschiede in der Plasmolyseform weitgehend überdeckt und beeinflusst werden von dem Alter der Blüte.

Osmotischer Wert:

Die Bestimmung des osmotischen Wertes in abgestuften Traubenzuckerlösungen brachte die folgenden Ergebnisse: Sowohl in der Außen- als auch in der Innenepidermis verlaufen osmotische Longitudinalgradienten. Während in der Außenepidermis der osmotische Wert von der Basis zur Spitze zu abnimmt, steigt der osmotische Wert in der Innenepidermis von der Basis bis zur Zone unterhalb der Bartschuppe. Der osmotische Wert der Innenepidermis liegt durchwegs höher als der der Außenepidermis. Das fortschreitende Altern der Blüte ist mit einer Ab-

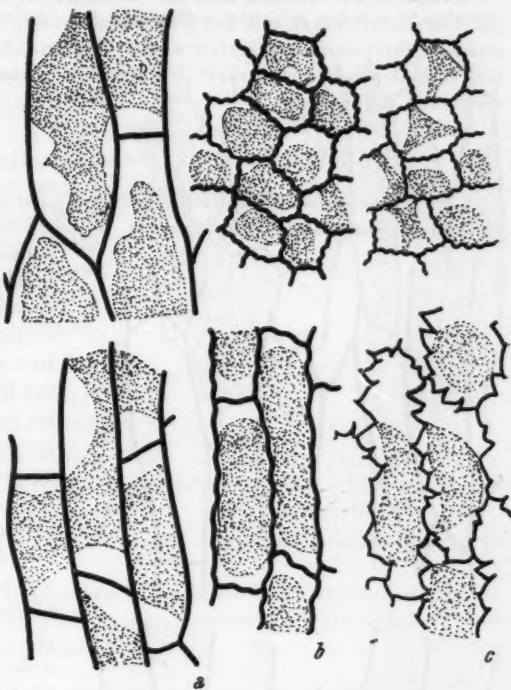


Abb. 8. *Convolvulus arvensis*: III. Verwelkte Blüte.
a Basis, b Längsstreifen, c Zwischengewebe.
Oben: Innenepidermis. Unten: Außenepidermis.

nahme des osmotischen Wertes verbunden (Tab. 10).

Permeabilität¹: Permeabilitätsversuche mit 1 und 2 mol. Glycerin- und Harnstofflösungen zeigten bei Bestimmung der Deplasmolysezeit deutliche Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis, die sich allerdings erst mit der fortschreitenden

Tabelle 10.

	Außenepidermis	Innenepidermis
Knospe . .	0,59—0,62	0,62—0,59
Reife Blüte	0,53—0,56	0,59—0,56
Alte Blüte	0,47—0,50	0,53—0,51

Entwicklung der Blüte herausbilden. Mit dem zunehmenden Alter

¹ Höfler (1936) untersuchte verschiedene Gewebe von *Gentiana Sturmiiana* und fand, daß die Plasmen der Korollzellen dem Glycerintyp angehören. Höfler führt diese Eigenschaft auf ein basisches Plasma zurück.

der Blüte ist eine ständige Abnahme der Permeabilität verbunden (Tab. 11).

Resistenz: Versuche über die Resistenz der Blüten, die in vollkommener Übereinstimmung mit den Versuchen bei den übrigen Versuchspflanzen durchgeführt wurden, konnten weder ausgesprochene Longitudinalgradienten noch deutlich ausgeprägte Unterschiede zwischen Außen- und Innenepidermis aufdecken.

II. Versuche mit *Gentiana asclepiadea*

Über die seismische Empfindlichkeit von *Gentiana asclepiadea* gehen die Meinungen auseinander. So berichtet Weber (1924) über verhältnismäßig rasche Schließbewegungen nach Stoßreizung. Bei Abkühlungsversuchen und durch Eintauchen in heißes Wasser konnte Weber ebenfalls einen Verschluss der Blüten erzielen. Jedenfalls ist *Gentiana asclepiadea* nicht zu den empfindlichsten Arten zu zählen. Der anatomische Bau der Blüte von *Gentiana asclepiadea* zeigt Ähnlichkeit mit dem Bau einer *Convolvulaceenblüte*. Bei den zellphysiologischen Untersuchungen, die bis jetzt allerdings mehr orientierenden Charakter besitzen, wurden daher in Anlehnung an die Untersuchungen an *Convolvulus* folgende drei Gewebepartien unterscheiden:



Abb. 9. *Gentiana Sturmiiana*.
a Zellen der Corollröhre, b Zellen unterhalb
des Corollzipfels.
Oben: Außenepidermis.
Unten: Innenepidermis.

1. Die Zellen der Längsstreifen der Außenepidermis;
2. die Zellen des Zwischengewebes der Außenepidermis;
3. die Zellen der Innenepidermis.

Die Ergebnisse der zellphysiologischen Untersuchungen waren kurz zusammengefasst die folgenden:

1. Innerhalb des Blattes verlaufen osmotische Longitudinalgradienten.
2. Die Innenseite besitzt stets einen höheren osmotischen Wert und eine

größere Durchlässigkeit als die Außenepidermis. In der Salzresistenz bestehen keine Unterschiede.

3. Beim Öffnen der Blüte erfolgt eine Abnahme der Durchlässigkeit für Glycerin und Harnstoff sowohl auf der Außen- als auch auf der Innenseite.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen setzten sich zum Ziel, mit Hilfe zellphysiologischer Methoden (Beobachtung der Plasmolyseform, Bestimmung des osmotischen Wertes, Feststellung der Permeabilität für Glycerin und Harnstoff, Nachweis der Resistenz) einen Beitrag zur Analyse einiger Blütenbewegungen zu liefern.

I. Versuche mit *Crocus vernus* und *Tulipa Gesneriana*

Die Untersuchung der als Wachstumsbewegungen aufzufassenden thermonastischen Bewegungen von *Crocus* und *Tulipa* brachten die Ergebnisse:

1. In den Blütenblättern bestehen in der Epidermis Longitudinalgradienten in bezug auf die Plasmolyseform, den osmotischen Wert und die Permeabilität für Glycerin und Harnstoff.

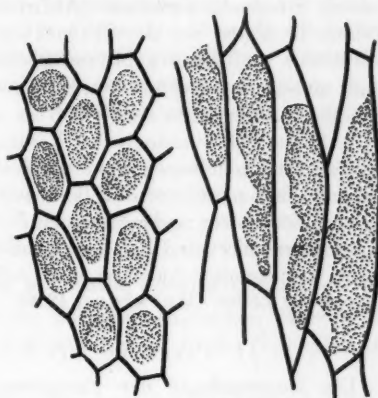


Abb. 10. *Gentiana Sturmiiana*: Verbindungsstück zwischen Corollzipfel und Bartschuppe.

Links: Knospe, rechts: ältere offene Blüte.

Tabelle 11.

	Glycerin			
	1 mol.		2 mol.	
	Innenepidermis	Außenepidermis	Innenepidermis	Außenepidermis
Knospe . . .	30 Min.	30 Min.	60 Min.	60 Min.
Reife Blüte .	90 Min.	60 Min.	270 Min.	120 Min.
Alte Blüte . .	150 Min.	75 Min.	∞	210 Min.

2. Die durch diese Gradienten bedingten Zonen erstrecken sich auf der Blattober- und -unterseite über verschieden weit ausgedehnte Bereiche der Lamina, wodurch sich physiologische Unterschiede der einander entsprechenden Stellen der Blattober- und -unterseite ergeben, die im Bereich der Bewegungszone deutlich ausgeprägt sind.

3. Bei dem Bewegungsvorgang treten deutlich nachweisbare Veränderungen in der Plasmolyseform auf, während der osmotische Wert und die Permeabilitätseigenschaften der Epidermiszellen nicht wesentlich verändert

werden. Die Änderungen in der Plasmolyseform stimmen mit den Ergebnissen Struggers (1935) über die Plasmolyseform von Zellen in verschiedenen Wachstumsstadien überein. Die Zellen reagieren auf Wärmereiz mit in den einzelnen Zonen der Blattlamina verschieden deutlich nachweisbarem Streckungswachstum (Auftreten von Krampfplasmolysen in den Zellen, in denen vor der Einwirkung des Wärmereizes konvexe Formen auftreten). Infolge der physiologischen Unterschiede zwischen Blattober- und -unterseite setzen diese Wachstumsbewegungen auf der Außenseite später ein als auf der Innenseite.

4. Diese zellphysiologischen Veränderungen während des Ablaufes der thermonastischen Bewegungen werden überdeckt von den Veränderungen, die mit dem natürlichen Ablauf des Alterungsprozesses der Blüten verbunden sind. Die nachgewiesenen Veränderungen in Plasmolyseform, im osmotischen Wert und der Permeabilität decken sich mit den in der Literatur vorliegenden Angaben über zellphysiologische Veränderungen beim Altern der Zellen (Marklund 1936).

II. Versuche mit *Convolvulus arvensis*

Die Untersuchung der Entfaltungsbewegungen der Convolvulaceenblüten, brachten folgende Ergebnisse:

1. Die drei unterschiedenen Gewebepartien, die Basis, die Längsstreifen und das Zwischengewebe, lassen sich in mancher Hinsicht im Sinne der protoplasmatischen Pflanzenanatomie kennzeichnen; so zeigen z.B. die Zellen der Längsstreifen eine besonders hohe Resistenz. Auch hier verlaufen in den Blütenblättern physiologische Longitudinalgradienten.

2. Die Epidermiszellen der Blattober- und -unterseite zeigen physiologische Unterschiede, die sich vor allem in der Plasmolyseform und in den Permeabilitätseigenschaften äußern; so sind die Zellen der Innenseite stärker permeabel für Harnstoff, die der Außenseite stärker durchlässig für Glycerin.

3. Der Öffnungsvorgang ist mit einer Zunahme des osmotischen Wertes, einer Viskositätssteigerung und einer Permeabilitätsverminderung besonders auf der Innenseite verbunden. Orientierende Beobachtungen über den Stärkegehalt der Zellen führten zu der Annahme, daß der Einfluß der Wärme auf den Öffnungsvorgang mit dem Kohlehydratstoffwechsel in Zusammenhang steht.

4. Der Schließvorgang läßt sich als ein ähnlicher nekrobiotischer Vorgang auffassen wie der Vergilbungsprozeß. Er ist ebenso wie der Vergilbungsprozeß (Reuter 1937) von einer Abnahme des osmotischen Wertes, einer Viskositätssteigerung und einer Permeabilitätsverminderung begleitet. Der Alterungsprozeß verläuft auf der Innenseite rascher als auf der Außenseite.

III. Versuche mit *Gentiana Sturmi* und *Gentiana asclepiadea*

Die anatomischen Untersuchungen der Corolle von *Gentiana Sturmi* legten eine Unterscheidung in drei Gewebepartien nahe: 1. Außenepidermis,

2. Innenepidermis, 5. Verbindungsstück zwischen Bartschuppe und Corollzipfel.

1. Zwischen Ober- und Unterseite bestehen physiologische Unterschiede, die sich im osmotischen Wert, der Plasmolyseform und der Permeabilität für Glycerin und Harnstoff äußern (die Außenepidermis ist stärker durchlässig sowohl für Harnstoff als auch für Glycerin). Diese Unterschiede kommen in den untersuchten Resistenzeigenschaften nicht zum Ausdruck.

2. Beim Öffnungsvorgang kommt es, worauf die Plasmolyseform hinweist, zu einem Streckungswachstum in dem Verbindungsstück zwischen Bartschuppe und Corollzipfel.

Der anatomische Bau der Blüte von *Gentiana asclepiadea*, der Ähnlichkeit mit dem der Convolvulaceenblüte zeigt, führte zur Unterscheidung von 1. den Zellen der Längsstreifen der Außenepidermis, 2. den Zellen des Zwischengewebes der Außenepidermis und 3. den Zellen der Innenepidermis.

1. Innerhalb des Blattes verlaufen osmotische Longitudinalgradienten.

2. Die Innenseite besitzt stets einen höheren osmotischen Wert und eine größere Durchlässigkeit als die Außenepidermis. In der Salzresistenz besteht kein Unterschied.

3. Beim Öffnen der Blüte erfolgt eine Abnahme der Durchlässigkeit für Glycerin und Harnstoff sowohl auf der Außen- als auch auf der Innenseite.

Für alle untersuchten Blütenblätter konnten also physiologische Longitudinalgradienten und Unterschiede zwischen Blattober- und -unterseite nachgewiesen werden. Diese physiologischen Unterschiede äußern sich im ganzen Entwicklungsablauf, so daß eine Corollflanke in ihrem natürlichen Entwicklungsablauf der anderen voraneilt. Was die Bewegungen der Blüten betrifft, so konnten für *Crocus*, *Tulipa* und *Gentiana Sturmi* innerhalb der Zellen bestimmter Bereiche jene protoplasmatischen Veränderungen nachgewiesen werden, die für Zellen im Stadium des Streckungswachstums charakteristisch sind. Die Schließbewegungen von *Convolvulus* weisen in zellphysiologischer Hinsicht alle Merkmale eines natürlichen nekrobiotischen Vorganges auf.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung von Frau Doz. Dr. L. Reuter durchgeführt; von ihr ist eine kurze Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse in dem Anzeiger der Akademie der Wissenschaften (Österr. Akad. d. Wiss. 1950, I) veröffentlicht worden. Herrn Prof. K. Höfler möchte ich auch an dieser Stelle für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und das rege Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegengebracht hat, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Literatur

- Bancher, E., 1938: Zellphysiologische Untersuchungen über den Abblühvorgang von *Iris* und *Gladiolus*. Österr. bot. Z. 87, 221.
Böhner, Ph., 1933: Über die thermonastische Blütenbewegung bei der Tulpe. Zeitschr. Botanik 26, 65.
— 1934: Zur Thermonastie der Tulpenblüte. Ber. d. Bot. Ges. 52, 336.

- Bünning, E., 1929: Über thermonastische und thigmonastische Blütenbewegungen. *Planta* 8, 698.
- Claus, C., 1926: Blütenbewegungen an Gentianaceen. *Flora* 120, 198.
- Dutrochet, H. J., 1837: Du reveil et du sommeil des plants. *Ann. d. sc. nat.*, II Ser., p. 6.
- 1837: *Memoires pour servir à l'histoire anatomique et physiologique des Végétaux et des Animaux*. Paris, p. 469.
- Goebel, K., 1924: Die Entfaltungsbewegungen der Pflanzen. Jena.
- Höfler, K., u. Stiegler, A., 1930: Permeabilitätsverteilung in verschiedenen Geweben der Pflanzen. *Protoplasma* 9, 469.
- Höfler, K., 1936: Permeabilitätsunterschiede in verschiedenen Geweben einer Pflanze. *Mikrochemie*, Molisch-Festschrift.
- Märkert, M., 1931: Über thermonastische Blütenbewegungen von *Tulipa*. *Bot. Archiv* 33, 501.
- Marklund, G., 1936: Vergleichende Permeabilitätserscheinungen an pflanzlichen Protoplasten. *Acta bot. Fenn.* 18.
- Pfeffer, W., 1873: Untersuchungen über Öffnen und Schließen an Blüten. Leipzig.
- Reuter, L., 1937: Protoplasmatik an vergilbenden Blättern. *Protoplasma* 27, 270.
- Schumacher, W., 1931: Über Eiweißumsetzung in Blütenblättern. *Jahrb. wiss. Bot.* 75, 58.
- Strugger, S., 1935: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen*. Berlin.
- Weber, F., 1924: Reizbewegungen an Gentianaceenblüten. *Österr. Bot. Z.* 73, 86.
- 1932: Über Eiweißumsetzung in Blütenblättern (Referat). *Protoplasma* 16, 162.

Sammelreferat

Der übermolekulare Aufbau der Cellulose

Von

E. Treiber

(Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der Universität Graz
in Zusammenarbeit mit der „Zellwolle Lenzing AG.“)

Mit 12 Textabbildungen

(Eingelangt am 20. Februar 1951)

Zweiter Teil

Während im ersten Teil des vorliegenden Sammelreferates [1] im wesentlichen nur der Bau des Cellulosemoleküls und der Micelle zur Sprache kam, soll es Aufgabe dieses Teiles sein, den Feinbau der Fasern bzw. Zellwände in den Vordergrund der Betrachtung zu stellen und somit den übermicellaren Aufbau der Celluloseablagerungen, angefangen von der Dimension der makroskopischen bzw. lichtmikroskopischen Zelle bis herab zum submikroskopischen Baustein, der Micelle zu beschreiben.

In Hinblick auf die technische Bedeutung gewisser Samenhaare, Bastfasern etc. als Textilrohstoffe sowie der „Holzfasern“ für die Zellstoffherzeugung, sollen diese „Celluloseträger“ in den Vordergrund der Darstellung gerückt werden. Dies erscheint um so berechtigter, als gerade jene aus obigen Gründen eine eingehendere wissenschaftliche Behandlung erfahren haben.

Jener Baustein der Pflanze, der die Synthese der Cellulose vollbringt, ist — wie eingangs erwähnt — die Zelle. Von den Hauptbestandteilen — Zellwand, Protoplasma und Zellkern — interessiert uns hier nur der erstere, die Zellwand oder -Membran, die die Zellen deutlich voneinander abgrenzt und einen Cellulosemantel darstellt.

Die Wandsubstanzen sind im wesentlichen: Cellulose, celluloseähnliche Kohlehydrate (Hemicellulosen oder Holzpolyosen) und Lignin neben kleineren Mengen von fett-wachsartigen Körpern, Eiweiß und Phosphatiden.

Einschaltend sei bemerkt, daß der Begriff Cellulose keineswegs stets eindeutig sein muß. Der Chemiker versteht unter Cellulose nur höhere Polymerisate von (monomeren) anhydriischen Glukoseresten, praktisch gesehen im wesentlichen jene, die der Techniker als α -Cellulose ($DP > 200$) kennzeichnet bzw. näherungsweise jene Cellulose, die vielfach „Cross und Bevan-Cellulose“ benannt wird und die noch mehr oder minder reichliche Mengen Hemicellulose (darunter versteht man allgemein β - und γ -Cellulose und nicht-cellulosige Kohlehydrate) enthält. Der Botaniker faßt den Begriff Cellulose weniger eng und versteht darunter im allgemeinen Cross- und Bevan-Cellulose,

bezieht gelegentlich aber auch die gesamte Hemicellulose (Holzpolyosen) ein, versteht unter Cellulose dann also das, was man mit Holocellulose (Skelettsubstanzen) zu bezeichnen pflegt (Ritter).

Bereits bei den höheren Algen begegnen wir verschieden geformten Zellen, die Teilaufgaben zu erfüllen haben und sich zu Geweben zusammenschließen. Besonderes Interesse besitzt im Rahmen unserer Darstellung das mechanische Grundgewebe mit seinen stark sekundär verdickten Wänden. So finden sich unter dem nicht mehr streckungsfähigen mechanischen Gewebe z. B. die technisch wichtigen Libriformzellen, die „Bastzellen des Holzes“ und die prosenchymatischen Bastzellen (Sklerenchym-Fasern), die in ihrer Dimension andere Zellarten weit hinter sich lassen können (z. B. bei

Ramie bis 250 mm Länge. Vgl. auch Tab. 2) und, bündelförmig vereinigt, das für die Textilindustrie unentbehrliche Material, wie Flachs, Nessel usw., bilden. Man spricht daher auch von textilen Bastfasern und versteht darunter in erster Linie Flachs (Lein), Hanf, Jute und Ramie (Chinagras). (Unter „Blattfaser“ versteht man z. B.

Tabelle 1 (nach Kollmann).

Zellform	Nadelholz	Laubholz
Tracheiden	etwa: 91%	etwa: —
Tracheen	—	20%
Libriformzellen . .	—	49%
Parenchymzellen . .	1,5%	13%
Markzellen	6%	18%

Pisang (Manilahanf), Sisalagave, die Hanfpalme, den neuseeländischen Flachs, die Faser des Paradiesfeigenbaums, Maguey Manso, Piassaba und die Faser der Yuccapflanze.)

Für die Zellstoffherzeugung sind — neben Materialien, wie Getreide- und Reisstroh, Gräser und ähnlichen Rohstoffen (Bambusrohr, Bagasse etc.), die in jüngerer Zeit wieder steigende Bedeutung erlangen — die cellulosereichen und mengenmäßig hervortretenden Hartholz-, „Fasern“ und die gefäßähnlichen Tracheiden des Nadelholzes von besonderer Wichtigkeit (Nadelholz ~ 91% Tracheiden; Laubholz ~ 49% Libriformfasern; z. B. Birkenholz ~ 66%. Vgl. Tab. 1). Sie sind im wesentlichen jene, die auch bei der Kochung und Bleiche praktisch intakt bleiben und an den Sieben zurückgehalten werden.

Unter den Pflanzenhaaren ist unbestritten die Baumwolle das wichtigste; Baumwolle stellt die wichtigste Textilfaser der Erde dar.

Baumwolle

Aus diesem Grunde wie auch insbesondere aus der Tatsache heraus, daß gerade der Feinbau der Baumwolle Gegenstand zahlreicher Arbeiten ist, scheint es berechtigt, einschaltend einige Tatsachen ins Gedächtnis zu rufen [2].

Die Baumwollpflanze als sehr altes Kulturgewächs kommt in vielen Arten, Varietäten und Bastarden vor [3]. Davon sind baum- und strauchartige Varietäten qualitativ besser als krautige.

Im Handel werden zwei Hauptarten unterschieden: die indische und die amerikanische Baumwolle. Zur ersteren gehört z. B. die kurzstapelige Baumwolle *Gossypium herbaceum* L. Zur zweiten die kurzfasrige Uplandbaumwolle (*Gossypium hirsutum* L.) und die durch besondere Länge und Güte ausgezeichnete Sea-Island-Baumwolle (*Gossypium barbadense* L.). Weitere wichtige Sorten sind noch Nankingbaumwolle (*Gossypium religiosum* Auct.) und *Gossypium peruvianum* Cav.

Die Baumwollfaser ist ein einzelliges, von der Oberhaut des Baumwollsamens — genauer von der Epidermis der etwa 300–400 μ dicken Samenschale — ausgehendes Haar [4] (vgl. Abb. 1). Es ist eine gestaltliche Abwandlung einer Epidermiszelle. Das Haar besteht aus einem verholzten Fuß, dem Basisteil, dem Mittelteil und der Spitze (Abb. 1). Die größte Breite liegt hinter der Mitte gegen den Fuß zu. So findet man z. B. bei einem 2,5 cm langen Haar von *Gossypium herbaceum* die Basisbreite zu 16,8 μ , den größten Durchmesser zu 21,0 μ . Die Spitze ist abgerundet, verdickt oder kegelförmig. Der Querschnitt ist nur stellenweise zylindrisch, die allgemeine Form ist eine mehr oder minder breitgedrückte. Die Samen sind während des Wachstums mit kurzen Stielen an der (inneren) Mittelsäule der ovalen Samenkapsel befestigt.

Die eigentliche Baumwollfaser (Langhaar) enthält gereift bis zu 95% reine Cellulose. Die Länge kann von 1,03 bis 4,05 cm variieren; der maximale Durchmesser von 11,9–42 μ . Die Mehrzahl der langen Haare liegt am breiten Ende des eiförmigen Samens. Auf der Samenoberfläche kann sich noch ein Haarfilz befinden; am spitzen Samenende sitzen die fettreicheren, mit einer schwach entwickelten Kutikula versehenen Barthaare. Haarfilz und Barthaare werden zusammen als Grundwolle (Linters) bezeichnet, die eine Länge bis zu einigen Millimetern erreichen kann. In der geernteten Baumwolle — die Kapseln werden im Stadium der Reife, d. i. etwa 50–90 Tage nach der Blüte gesammelt — finden wir noch unreife Haare sowie tote Haare als pathologisches Produkt.

Bei den einzelligen Pflanzenhaaren, wie z. B. Baumwolle, wird die Mittellamelle bzw. Mittelschicht (siehe Seite 373) durch die Kutikula ersetzt. Sie ist an reifen Baumwollhaaren deutlich erkennbar [5] und bewirkt die „Seidigkeit“ der Faser und ihre Unbenetzbarkeit; die Dicke ist geringer als 0,1 μ . Durch den technischen Bleichprozeß wird die Kutikula größtenteils zerstört. Ein Querschnitt durch ein Baumwollhaar zeigt Kutikula, Primärwand, eine Sekundärwand von großer Mächtigkeit (ein bis zwei Drittel des Durchmessers), die durchaus den Bastfasern vergleichbar (mit Ausnahme der noch stärker entwickelten Flachs Zellwand) und lamellar gebaut ist, und das Lumen (Abb. 1 c und 3 c). Das Lumen der Zelle wird durch das Austrocknen an der Luft leer, die Faser fällt zusammen und dreht sich korkzieherartig um sich selbst. Dadurch haften die Fasern bei der Garnerzeugung gut aneinander.

Protoplasma, Bd. XL/2.

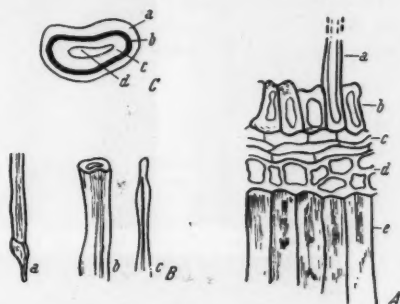


Abb. 1.

A Oberteil der 300–400 μ dicken Samenschale von *Gossypium herbaceum*.

- a Baumwollhaar,
- b Epidermis,
- c Pigmentschicht,
- d Kristallschicht,
- e Pallisadenzellen.

B Baumwollhaar.

- a Fuß,
- b Mittelstück,
- c Spitze.

C Querschnitt durch das Baumwollhaar.

- a Kutikula,
- b Primärwand,
- c Sekundärwand,
- d Lumen.

(Von den Baumwollgewächsen [*Bombacaceae*] sei erwähnt der Kapok- oder Wollbaum, der die Kapokfaser oder Ceibawolle liefert, und der malabarische Wollbaum [*Silk-Cotton*].)

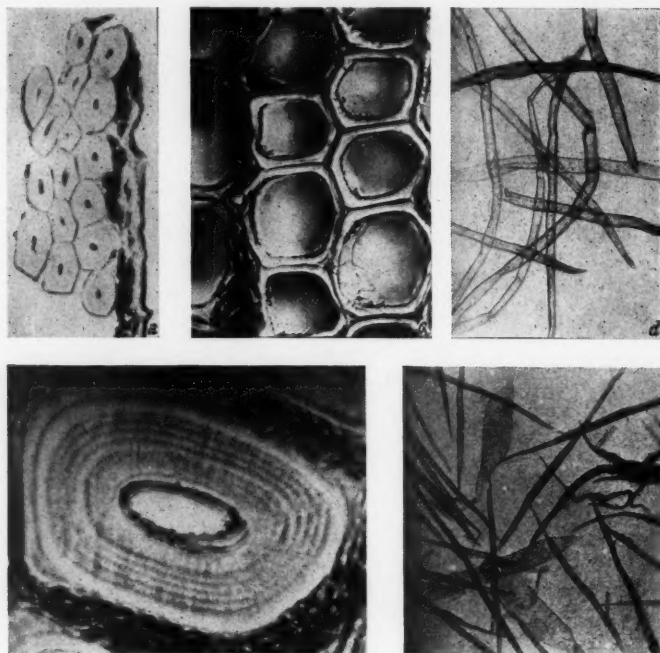


Abb. 2.

- a Querschnitt durch eine Flachsfaser nach Herzog.
- b Querschnitt durch eine Holzfaser nach I. W. Bailey. Auf dem Bild sind die konzentrischen Lagen der Cellulose in der verdickten Sekundärwand (hell) zu sehen. Die äußeren, dunklen Partien enthalten Lignin.
- c Querschnitt durch Fichtenholz nach Bucher (Mittellamelle durch Bisulfit angegriffen).
- d Nadelholzzellen aus dem Verband gelöst (Natl. Bur. Standards).
- e Hartholzzenen aus dem Verband gelöst (Natl. Bur. Standards).

Speziell von Fasern sprechen wir also dann, wenn dieselben mehr oder minder leicht von den übrigen Pflanzenteilen abgetrennt werden können, wobei ihnen besonderes Interesse von technischer Seite zukommt, wenn sie unmodifiziert einer direkten textilen Verwertung zugeführt werden können. Durch verschiedene Anforderungen (Reißfestigkeit, Länge, Dauerhaftigkeit, Farbe usw.) wird aus der großen Zahl nativer Fasern eigentlich eine kleine Gruppe — die in der obigen Einleitung großteils bereits kurz charakterisiert wurde — herausgegriffen, die man, wie im vorangehenden angedeutet, in vier Untergruppen unterteilen kann (R. F. Nickerson [6]):

Samenhaare (z. B. Baumwolle und Linters, Kapok [Ceibawolle]).

Bastfasern. (Sie finden sich im Bast [Phloem] der Pflanze und unterscheiden sich von den übrigen Pflanzenzellen durch beträchtliche Länge und erhebliche Wandverdickung. Im Gegensatz zu Baumwolle wird z. B. die Flachs- und Jutefaser aus mehreren kleinen länglichen Bastzellen gebildet [siehe Abb. 2 a]. Beispiele: Flachs, Hanf, Sunnhanf, Jute, Ramie, Nessel, Kenaf.)

Blattfasern (kommen in langen, schwertähnlichen Blättern als vielzellige Fasern vor. Z. B. Sisal, Manilahanf, Neuseeländischer Flachs, Phormium).

Holz-„Fasern“. (Kleine Zellen bis zu etwa 5 mm Länge, mehr oder minder mit Nichtcellulosesubstanzen verkittet [z. B. durch die weitgehend aus Lignin bestehende Mittellamelle] und mit Lignin und ligninähnlichen Substanzen sowie Pentosanen durchsetzt [Abb. 2 b bis e].)

Tab. 2. Ungefähre Größe einiger wichtiger Fasern und Zellen [6].

Faser:	Untergruppe	Faserlänge in mm	Faserdurch- messer in μ	Zellenlänge in mm	Zelldurch- messer in μ
Baumwolle	Samenhaar	15— 56	12— 25	15 — 56	12— 25
Flachs . . .	Bastfaser	200—1400	40— 620	4 — 66	12— 76
Jute	Bastfaser	1500—3600	30— 140	0,8 — 5	10— 25
Hanf	Bastfaser	1000—3000	—	5 — 55	16— 50
Ramie . . .	Bastfaser	100—1800	60—9040	60 —250	16—126
Manilahanf	Blattfaser	1800—3600	12— 280	3 — 12	12— 46
Sisal	Blattfaser	750—1200	100— 460	1,5 — 4	16— 32
Holz	„Holzfaser“	—	—	0,14— 5	variabel

Die Struktur der Zellfaserwand

Bei der Betrachtung eines allgemeinen Querschnitts durch die letzte Fasereinheit, durch die Zelle innerhalb eines Zellverbandes, können wir die Primär- oder Mittelschicht, die Sekundärwand und das Zellumen (Zentralkanal, der in der lebenden Zelle mit Protoplasma gefüllt, in der toten Zelle hohl ist mit Ausnahme ausgetrockneter Protoplasmarückstände¹) unterscheiden [7, 8, 9] (siehe Abb. 2 b, c und Abb. 3 a; vgl. ferner Abb. 8).

Die Terminologie der verschiedenen Strukturelemente ist in der Literatur keineswegs einheitlich und unmißverständlich. Am zweckmäßigsten ist die Einteilung von Kerr und Bailey [10], der sich auch weitestgehend Frey-Wyssling anschließt.

Die Entstehung und Natur der Mittelschicht

Für die Entstehung der Mittellamelle und der genetisch eng damit verknüpften Primärwand — die als cellulosehaltig für uns hier von Interesse ist — müssen wir den Vorgang der Zellteilung im Zellverband kurz betrachten.

¹ Namentlich in den großen Zellen der Schlauchalgen, auch in Pollenschläuchen, weiltumigen Wurzelhaaren und ähnlichen Objekten ist nicht selten zu beobachten, wie einzelne Teile des Protoplasmas, große und kleine Stücke des Wandbelags oder des das Zellumen durchziehenden Balkensystems oder streckenweise die gesamte plasmatische Zellenfüllung erhärten und daß dabei eine zellwandartige Substanz aus dem Protoplasma hervorgeht (celluloseige Degeneration).

Wodurch die Zellteilung induziert wird, ist unklar. Gurwitsch [11] z. B. schreibt sie einer mitogenetischen Strahlung zu, andere einem Wachstumshormon (Meristine), andere wieder Wachstumsreizen, wie sie durch organische Säuren bzw. p_g -Änderungen ausgelöst werden sollen [12]. Bei dieser Teilung wird nach Frey-Wyssling [7, 13] Cellulose neben anderen Zellwandsubstanzen, wie Protopektin usw., submikroskopisch in dem Phragmoplast (dem System der Kernspindel) vor-

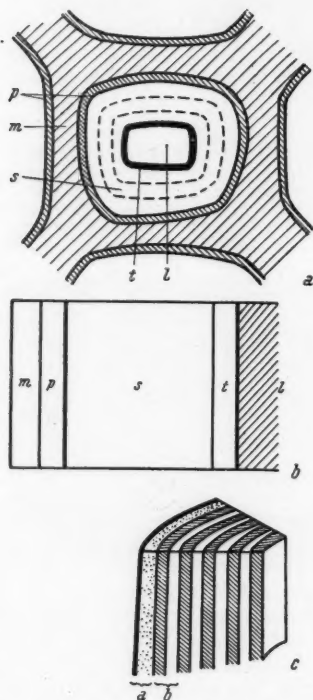


Abb. 3.

a Schematischer Querschnitt durch eine Zelle.

p Primärwand } Mittelschicht,
m Mittellamelle }
s Sekundärwand mit
t Tertiärwelle,
l Lumen.

b Längsschnitt durch eine Zelle aus einem Zellverband.

m Mittellamelle,
p Primärwand,
s Sekundärwand,
t Tertiärlamelle,
l Lumen.

c Schematischer Ausschnitt aus einem Baumwollhaar.

a Kutikula mit Primärwand,
b Tagesring mit Sekundärwand
(vgl. Abb. 7 b).

gebildet und von dort in der zweiten Entwicklungsstufe, maskiert mit Pektinsubstanzen und Wachs auf die Mittellamelle, dem Produkt der Zellplatte, abgelagert.

Betrachtet man näher z. B. an Zellen der Staubfädenhaare von *Tral. descantia virginica* in vivo die Zellteilung, so beobachtet man in der Mitte der Spindel, die die Tochterkerne verbindet, eine „Zellplatte“, hervorgegangen aus Tröpfchen [14, 15], die eine Braunsche Bewegung zeigen, als Anfangsstadium der neuen Querwand. Diese freischwebende, isotrope, körnige Platte, die zunächst nur eine Pektinreaktion gibt, vergrößert sich innerhalb weniger Stunden zentrifugal und erreicht schließlich die Membran der Mutterzelle. In dem Augenblick liegen zwei Zellen vor. Diese Mittellamelle ist ein isotropes interzelluläres Kittmaterial und wird nun auf beiden Seiten von einer Primärwand umgeben. Diese wird aus dem Phragmoplast, den beiden anliegenden Spindelfasersystemen, gebildet, welches Cellulose, gemischt mit Protopektinen, sofort an diese Mittellamelle ablagert. Mittellamelle und Primärwand bilden die Mittelschicht.

Nach Becker und Belar [16] soll die Zellplatte in zwei dünne Häute spaltbar, also paarig angelegt sein und nach Priestley [17] primär aus Eiweißkörpern gebildet werden, aus denen sich dann die Pektine bilden. In der zweiten Ent-

wicklungsstufe wird — wie bereits erwähnt — Cellulose bzw. die dünne anisotrope Primärwand an diese abgelagert.

Nach den Untersuchungen von Bailey und Sharp [18] wird die Zellplatte nicht von den plasmatischen Faserzügen der Spindel gebildet, sondern sie entwickelt sich unabhängig davon.

Über die chemische Natur der Mittellamelle ist wenig bekannt [19]; sie gibt eine Pektinreaktion und im fortgeschrittenen Alter ist amorphes Lignin (wahrscheinlich aus dem Pektin entstanden [20]), durchtränkt mit Hemicellulosen nachweisbar. Die Mittellamelle wird als erstes Wandgebilde von der Ligninifizierung betroffen und bleibt der ligninreichste Teil. Nach Lüdtkke [21] soll Ligninbildung überhaupt nur auf diese beschränkt bleiben. Hingegen findet Jayme [22] auch in der Sekundärwand von Buchenholzfasern eine, wenngleich uneinheitliche Verteilung von Lignin. Nach Bailey und Kerr enthalten auch andere primäre und sekundäre Zellwände Lignin. Einen auffallend hohen Ligningehalt in inneren Schichten finden Preston und Singh an Bambusfasern. Jedoch wird die Mittellamelle übereinstimmend als cellulosefrei angenommen. Diese ligninische, isotrope Mittellamelle wird auch beim Aufschluß der Holzfaser am raschesten angegriffen. Gewisse Quellungserscheinungen sowie die Tatsache, daß auch weitgehend aufgeschlossene Schnitte zusammenhalten, sprechen jedoch dafür, daß die Mittellamelle nicht aus reinem Lignin bestehen dürfte, sondern daß noch weitere nicht-ligninische Substanzen am Aufbau beteiligt sind [23, 24] (Interzellulärsubstanz).

Bei einzelligen Pflanzenhaaren fehlt die Mittellamelle. Zum Schutz wird die Kutikula gebildet, die nach Ansicht einiger Autoren beim Baumwollhaar als definierte Schicht auf der Primärwand aufsitzt (vgl. Abb. 3 c), im Gegensatz zu den meisten Beobachtungen an kutinisierten Zellen, wo Wachse und Pektine mehr oder minder vollständig und undifferenziert die Primärwand durchsetzen. Es würde also hier praktisch die beim Hautgewebe meist vorhandene Kutikulärschicht (Wisselingh) fehlen. Die isotrope Kutikula soll aus reinem amorphen Kutin (Wachssubstanzen) bestehen. (Eine tatsächlich cellulosefreie Kutikula konnten Legg und Wheeler an der Agave beobachten.) Die übermikroskopische Aufnahme einer Baumwollkutikula [25] (15 000fach) zeigte nur das Vorliegen eines feinen strukturellen Häutchens. Dischendorfer [26] will allerdings an der Baumwollkutikula in der Längsrichtung der Faser eine zarte feinkörnige Streifung beobachtet haben. (Über angebliche Querelemente wie Kutikulargürtel oder Manschetten siehe Kugelquellung.) Hinsichtlich weiterer Einzelheiten vgl. Abschn.: „Primärwand“ (S. 374, 378).

Man neigt zur Annahme, daß die Kutikula in flüssigem Zustand ausgeschieden wird und an der Oberfläche, vermutlich durch den Einfluß von Sauerstoff und Licht, polymerisiert. Hienach würden Kutinsäuren im niederpolymeren Zustand gelöst durch die Wand hindurchwandern, und es wäre nicht ausgeschlossen, daß auch diese Substanzen gleichfalls vom Protoplasma gebildet werden.

Dem hochmolekularen Membranstoff Kutin muß ein ähnliches Polymerisationschema wie den Etholiden zugrunde liegen. Es sind räumlich vernetzte Polymerisate mit Ester- und Ätherbrücken. Kutin absorbiert übrigens UV-Licht und verhält sich als hochpolymeres Gerüstanon.

(Komplizierter ist die submikroskopische Struktur einer Kutikulärschicht. Es gilt hier die submikroskopische Anordnung der Membranstoffe der Kutikulärschicht: Kutin bzw. Kutinwachse, Cellulose und Pektinstoffe aufzuklären. Frey-Wyssling [7] gibt ein Modell: Wir haben hydrophile Lamellen, die aus Cellulose und Pektinen bestehen, und Schichten aus radial angeordneten Wachsmolekülen. Dazwischen ist ein unorientiertes Kutingitter eingebaut, wobei es wahrscheinlich

ist, daß die hydrophilen Gruppen des Kutins [$-\text{OH}$, $-\text{COOH}$] der Cellulose, die hydrophoben [$-\text{CH}_3$] den Wachsen zugekehrt sind. Siehe auch S. 376.)

Die Primärwand

Der Primärwand kommt als äußerster Abschluß der isolierten individuellen Zelle in Hinblick auf das Verhalten derselben gegenüber ihrer Umgebung, insbesondere gegenüber einwirkenden Agenzien, eine besondere Bedeutung zu. Sie widersteht auch weitaus am längsten dem Angriff aller Aufschluß- und Bleichmittel. Selbst Kupferoxydammoniak (Cuoxam) löst sie verhältnismäßig langsam. Sie quillt auch nur wenig und wird weder nennenswert gedehnt noch schrumpft sie z. B. durch Delignieren. Hingegen

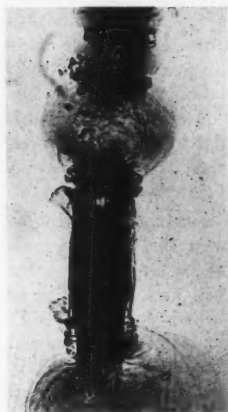


Abb. 4. Beispiel einer Kugelquellung nach Bucher.

quillt unter dem Einfluß von Alkali die Sekundärwand stark auf, so daß — durch die Behinderung der freien Quellung nach außen durch die Primärwand — das Lumen stark verkleinert wird und der Faserquerschnitt rundliche Formen annimmt. Diese pralle Füllung der Faser mit gequollener Cellulose tritt noch deutlicher hervor, wenn man die aufgeschlossene Faser in Kupferoxydammoniak nachquillt. Die Primärwand wird durch den Quellungsdruck der Sekundärwand ausgerundet und es kommt zum Erscheinungsbild der Kugelquellung (siehe Abb. 4).

Für die Erscheinung einer nicht einheitlichen Quellung und für die Tatsache, daß die kugelförmigen Aufquellungen in mehr oder minder regelmäßigen Abständen auftreten, wird von Lüttke die Existenz von Querelementen angenommen (vgl. Abb. 8). Bei der Baumwolle z. B. soll in bestimmten Abständen die Kutikula an die Primärwand angewachsen sein (Kutikulargürtel). Das Vorhandensein solcher Querelemente scheint jedoch durch neuere Untersuchungen widerlegt zu sein. Den Effekt führt Wergin [27] auf ein ringförmiges Zusammenschieben der teilweise aufgeplatzten

Kutikula zurück. Gestützt wird diese Ansicht durch einen Modellversuch mit einer künstlichen Kutikula an oberflächlichen esterifizierten Cellulosespinnfasern (Stearinsäureanhydrid). Dieselbe kann sich beim Quellen von der Faser abheben und legt sich dann in Ringe und Spiralen um diese (Schneider [28]).

Es wird allgemein angenommen, daß in allen pflanzlichen Fasern die Primärwand als ein hinsichtlich ihres physikalischen Verhaltens, vielleicht auch chemischen Charakters, deutlich von der Sekundärwand differenziertes Gebilde sich abhebt (vgl. Wardrop, Seite 4). Ihre Anisotropie ist durchwegs gering. Sie ist praktisch nicht spaltbar, und, wenn Risse entstehen, bilden sie sich quer zur Faserrichtung aus [29].

Eine mikroskopische Beobachtung der Primärwand ist an jugendlichen Zellquerschnitten leicht; bei Ginsterfasern z. B. ist dieselbe sogar sehr kräftig entwickelt. Schwieriger wird die Untersuchung im älteren Stadium, wo sie durch die sekundäre Wandverdickung überdeckt ist. So wird z. B. beim Baumwollhaar etwa ab dem 16. Tag, an dem anscheinend das Wachstum der Sekundärwand beginnt, die Primärwandstruktur durch die Sekundär-

schicht so verdeckt, daß Einzelheiten nur sehr schwer zu beobachten sind [50]. Bei den meisten verholzten Geweben kann sie nur an sehr dünnen Schnitten und häufig erst nach Mazeration beobachtet werden [23].

Untersuchen wir die Primärwand einer jungen, teilungsfähigen Zelle (meristematische Primärwand) mikrochemisch, so können wir keine Cellulose nachweisen [31].

Röntgenographische Aufnahmen von Gundermann, Wergin und Hess [32] an der in Streckung befindlichen Zelle von *Avena Coleoptiles* nach Entfernung der Epidermis zeigten die Faserperiode der Cellulose. Daß nur die Basisebenen zur Reflexion kommen, wird damit erklärt, daß die Cellulosefäserchen aus einer zu geringen Anzahl von Cellulosemicellen bestehen. Nachdem

Frey-Wyssling und Mitarbeiter zeigen konnten, daß aller

Wahrscheinlichkeit nach Mikrofibrillen von praktisch derselben Dimension (etwa 200 bis 300 Å) Sekundär- und Primärwand auf-

bauen, könnte die Flauheit der Röntgenogramme auch auf einer Verschiedenheit in der Kristallinität beruhen (Frey-Wyssling [33]). Diese Auf-

fassung wird durch eine röntgenoptische Untersuchung von Wardrop [33a] gestützt, der im Gegensatz zu den Micelldimensionen der Sekundärwand in der Primärwand (*Pinus sylvestris*, *Avena coleoptiles*) eine Micellbreite von ~ 18 Å und nach der Entfernung der Pectine und anderer Wandsubstanzen

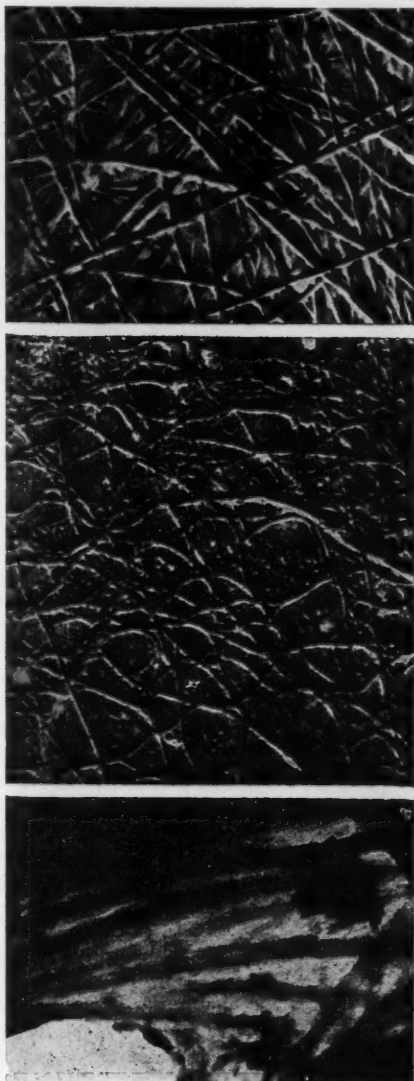


Abb. 5. a Elektronenmikroskopische Aufnahme der Primärwand eines 15 Tage alten Baumwollhaares (Eisenhut und Kuhn). b Wachsende Primärwand aus der Maiskeimkeule (Frey-Wyssling). c Bakterienzellulose (Mühlethaler).

eine solche von $\sim 26 \text{ \AA}$ findet. Dieser Effekt weist auf eine Kristallisations-

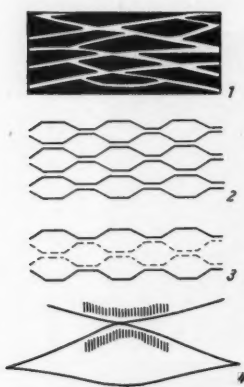


Abb. 6a. Schema der Primärwand nach Frey-Wyssling.

- 1 Submikroskopisches Strukturschema der meristematischen Primärwand von prosenchymatischen Zellen. Cellulosegerüst, eingebettet in Pektin und Wachs.
- 2 Micellares Cellulosegerüst, idealisiert als Rautennetz.
- 3 Intussuszeptionswachstum: nach Lösung der Haftpunkte schieben sich neue Cellulosefäden (-----) ein.
- 4 Maskierung der Cellulosefäden durch kristallines Wachs (mmmmmm).

zwischen bereits vorhandenen, dem Zettel vergleichbaren Fibrillen eingezogen werden). In den Maschen des zarten, netzartigen Cellulosegerüsts liegen die von Hess und Mitarbeitern [34] näher beschriebenen, kristallinen Pflanzenwachseinlagerungen; kurze Wachsketten, die Röntgeninterferenzen entsprechend einer Periode von 60 und 85 \AA ergeben. Da die Wachse extrem hydrophob, die Celluloseketten dagegen sehr hydrophil sind, können sich beide Membranstoffe nicht direkt berühren. Als Zwischensubstanz werden teils Polypeptidketten, teils Pektine angenommen. Die Anwesenheit bzw. die Maskierung der Cellulose mit Pektin und Wachs (nach Hess und Mitarbeiter durch die „Substanz X“ [35]) ist auch der Grund, warum in den Primär-

behinderung hin sowie auf die Möglichkeit eines „Nachkristallisierens“ nach der Entfernung dieser Stoffe. Die Frey-Wysslingschen Mikrofibrillen der Primärwand sind somit auf alle Fälle supermicellare Einheiten (vgl. auch Seite 392 und Fußnote). Hessler und Mitarbeiter [33b] finden auch im DP-Grad Unterschiede; für die Primärwand von Baumwolle finden diese den Wert 5940, in der Sekundärwand hingegen 10 650 (vgl. auch Teil I, Seite 167). Wenngleich auch die meristematische unverdickte Primärwand nur wenig Cellulose enthält, so bilden doch die Celluloseketten bereits ein zusammenhängendes feines Gerippe [7]. Die Cellulosefibrillen sind in den Primärwänden nach einer „Streuungstextur“ angeordnet, im allgemeinen mit einer Betonung der Richtung quer zur Faserachse (Röhrentextur nach Frey-Wyssling). Von Preston [33c] wurden licht- und röntgenoptisch die Endzellen des Cambiums der Koniferen untersucht (Primärwände) mit dem Ergebnis, daß die Textur dieser wachsenden Zellen tatsächlich etwa der Röhrentextur Frey-Wysslings entspricht. Die Fibrillen schwanken um einen Winkel zwischen 74 und 90° mit der Faserachse, liegen also betont quer zu dieser (vgl. Abb. 6a, Fig. 1). Übermikroskopische Aufnahmen an Primärwänden (Flachsfaser, Wurzelmeristem eines Maiskeimlings, Baumwolle und andere) konnten ein richtiges Geflecht sichtbar machen (Abb. 5b); eine solche Verwebung von Fibrillen erklärt, warum die Primärwände im Gegensatz zu den Sekundärwänden kaum spalten und nicht in feinere Lamellen zerlegt werden können. Nach Frey-Wyssling [33] kann ein solches Flechtwerk nur zustande kommen, wenn alle Fibrillen im wandständigen Cytoplasma gleichzeitig entstehen, wobei die Textur im Plasma vorbestimmt sein muß oder wenn die Fibrillen ein Spitzenwachstum aufweisen (im letzten Falle könnten sie als „Schuß“

wänden Cellulose mikrochemisch nicht unmittelbar nachweisbar ist. Jedoch ist die Cellulose durch ihre Doppelbrechung zu erkennen, nachdem derartige Pektine überhaupt keine Doppelbrechung zeigen und auch die fetten Wachse (kurze Ketten vom Typus $C_nH_{2n+1}CO-O-C_mH_{2m+1}$; n und m zwischen 24 und 33) in den Radialschnitten ihre Doppelbrechung vermissen lassen [36]. Bei der Baumwolle läßt sich die Matriz von Wachs und Pektin, in der das Cellulosenetzwerk eingebettet ist, durch eine geeignete Behandlung weg-lösen, so daß das Celluloseskelett zurückbleibt. Ein solches zusammenhän-gendes Gebilde aus verwobenen Micellbündeln konnte auch Elvers im Elektronenmikroskop nachweisen [37]. Auch Aufnahmen zwischen gekreuz-ten Nicols an unreifer Baumwollfaser zeigen eine netzförmige Struktur.

Die folgende Zellstreckung oder das Streckungswachstum, jene Wachstumsperiode, während der die meristematischen Zellen ihre Längen in kurzer Zeit vervielfachen, bevor sie in den Dauerzustand übergehen, geht nun keineswegs auf eine passive Dehnung durch die Spannung des lebenden Inhalts durch Wasseraufnahme zurück. Ein elastisches Nachgeben ist nur als erster Schritt anzunehmen. Welche Leistungen die einzelnen Pflanzen wäh-rend dieses Streckungswachstums vollbringen, zeigen einige Zahlen: so wächst die Koleoptile von *Avena sativa* um 3,7 cm pro Tag und die Roggen-filamente um 2,5 mm in der Minute. Es wird nach Frey-Wyssling und Mitarbeiter [38] vielmehr das Flechtwerk lokal gelockert (Mühlethaler [39]) und neu entstandene Cellulosemikrofibrillen schieben sich ein. Die „Erweichung“ der Wand, die Texturauflockerung, wird indirekt hormonal durch Wuchsstoffe geregelt. Nach der Intussuszeption wird die Plastifizierung, zum Teil auch Auflösung gewisser Wandpartien, rückgängig gemacht und die Membran verfestigt sich, worauf sich neue, plastifizierte Felder aus-bilden. Die Membran wächst also nicht als Ganzes, sondern mosaikartig in die Fläche, wodurch sich bisher schwer erklärbare lokale Wachstumserschei-nungen verstehen lassen [33]. Schon vor den überzeugenden elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von Mühlethaler hat Frey-Wyssling (1936) ein nunmehr weitgehend verifiziertes Schema des Flächenwachstums primärer Zellwände gegeben: Bei dem Intussuszeptionsvorgang werden — nachdem sich der Charakter der Doppelbrechung nicht ändert — die sicher-lich festen Haftpunkte eines netzförmigen Cellulosegerüsts (Abb. 6a, Fig. 1) — welches man schematisch als Rautennetz idealisieren könnte (Abb. 6a, Fig. 2) — gelöst [40], so daß eine Erweichung der Primärwand ein-tritt. Durch diese stark aufgelockerte plastifizierte Textur kann durch den Turgordruck die Fläche nunmehr vergrößert werden, worauf sich neue Fäden einziehen (Abb. 6a, Fig. 3). Die vornehmlich quer verlaufenden Fibrillen behindern als Hauptvalenzketten eine stärkere Querdehnung (nachdem ein Aufspalten der Hauptvalenzbindungen senkrecht zur Faser-länge nicht anzunehmen ist) [36], wodurch sich die als Streckungswachstum gekennzeichnete längsgerichtete Flächenvergrößerung ergibt (z. B. Roggen-staubfäden vor der Zellstreckung: Länge 3,1 mm, Dicke 112 μ ; nach der Zell-streckung: Länge 15 mm, Dicke 103 μ ; die Wurzelenden von *Triticum vul-gare* verlängern sich um das 20fache, die Epidermiszellen der Haferkoleop-titen um das 150fache und das Baumwollsamenhaar innerhalb 15 Tagen um das rund 1000fache). Nach der Intussuszeption werden die Haftkräfte an den Berührungspunkten wieder verstärkt und die Membran verfestigt sich. Die Haftkräfte werden als Dipolkräfte von der Art der Sekundär-oder Restvalenzen aufgefaßt. Ihre Stärke ist abhängig von der Hydratisie-

rung der heteropolaren Gruppen, und das beim Wachstumsprozeß geschilderte Lösen und Wiederverfestigen scheint eine Folge des jeweiligen Hydrationszustandes zu sein [41].

Die Membran stellt ihr Flächenwachstum ein, wenn die äußeren und die im Plasma liegenden Bedingungen die erforderlichen Voraussetzungen nicht mehr erfüllen. Es wäre auch denkbar, daß die Struktur der Wand sich soweit verändert hat, daß eine weitere Neueinlagerung von Wandteilen nicht mehr möglich ist bzw. intermicellare Einlagerungen von Lignin etc. den weiteren Einbau von Cellulosemicellen hemmt.

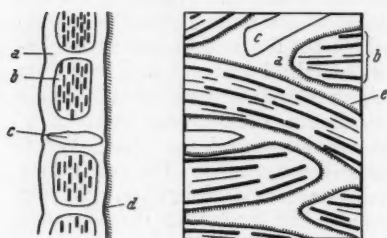


Abb. 6b. Schema der Primärwand nach Hess, Wergin und Kiessig (Querschnitt und Tangentialschnitt).

- a Wachs,
- b Celluloseketten + Pektin,
- c Spaltöffnung,
- d Plasmagrenzschicht,
- e Phosphatidschicht.

Ein etwas abweichendes Modell entwickelten Hess, Wergin und Kiessig [34] (Abb. 6b). Demzufolge besteht die Primärwand aus einer gittermäßig geordneten Wachssphase, in der Cellulosebalken, umhüllt von einer Phosphatidschicht eingebettet sind. Weiters finden sich Spalträume in der Wachsschicht. In den einzelnen Cellulosebalken ist die Cellulose im unbehandelten Zustand gitterungeordnet, da eingelagertes Pektin die Kristallisation stört. Aus

diesem Grund zeigt auch unbehandelte Cellulose in der Primärwand keine Interferenzen.

Die Primärwand der Baumwolle ist etwa $\leq 0,5 \mu$ dick und enthält außer Cellulose noch Pektine (Polygalacturonsäuren in Verbindung mit *i*-Arabinose und *d*-Galactose) und Wachse (Kutin; vgl. die Seiten 373, 374). Sie führt in der neueren Literatur die Bezeichnung Kutikula (cuticle) [42]. Ob eine definierte äußere Wachsschicht existiert, die auf der Primärwand aufsitzt und in diesem Falle streng als „Kutikula“ zu bezeichnen wäre, wie bei der Agave, ist umstritten.

Lediglich diese Primärwand ist während der ersten 15 bis 20 Tage des Längenwachstums vorhanden, dann erst wird die Sekundärwand an der Innenseite niedergelegt unter Verkleinerung des Zellumens.

Die Primärwand besteht ebenfalls aus einem Netzwerk aus Cellulose, das teilweise als Übereinanderlagerung von drei flachgängigen Spiralsystemen (Anderson, Kerr, Hock, Ramsay, Harris [43, 44]) aufgefaßt wurde. Nachdem jedoch nie eine Aufspaltung in drei Lamellen beobachtet werden konnte, ist wohl — auch auf Grund elektronenmikroskopischer Aufnahmen (Elvers) — mit Sicherheit anzunehmen, daß die unter verschiedenen Vorzugsrichtungen verlaufenden Cellulosestränge zu einem Gewebe verwoben sind.

Analoge Beobachtungen wurden auch an Flachsfasern gemacht [45]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein Gewebe von Mikrofilbrillen. Auch hier sind nicht alle Richtungen gleichmäßig mit Filbrillen belegt, sondern es gibt zwei sich etwa senkrecht überkreuzende Hauptrichtungen. Ähnliche Verhältnisse finden sich bei anderen Primärwänden.

Die Sekundärwand

Die Sekundärwand verdankt ihr Entstehen dem Dickenwachstum. Die Frage, ob das Dickenwachstum ein Appositions- oder

Intussuszeptionswachstum ist, scheint wohl zugunsten der ersten Auffassung, d. h. einer Ablagerung von der Plasmaseite her, entschieden zu sein. (Wiehler [46] führte auch das Dickenwachstum auf Intussuszeption zurück, nachdem das Dickenwachstum zwischen Primärwand und Innenhaut [Tertiärlamelle] erfolgen soll, von der Dippel feststellte, daß sie eher erscheint als die sekundäre Verdickungsschicht.)

Die reiche Produktion von Cellulose in der Sekundärschicht muß nicht immer ökologische Bedeutung im Sinne einer Festigung der Organe (Steinzellenmäntel, Sklerenchymbündel, Kollenchymstränge, Bewegungsgewebe) besitzen: vielfach ist diese Produktion ein Zeichen des Alterns. Die Cellulose spielt dann die Rolle eines Exkretes, mit dessen Bildung Leistungs- und Bewegungsfähigkeit gemindert werden und das Protoplasma sich völlig verausgaben kann.

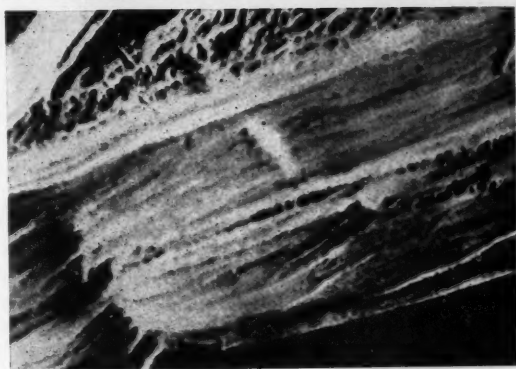
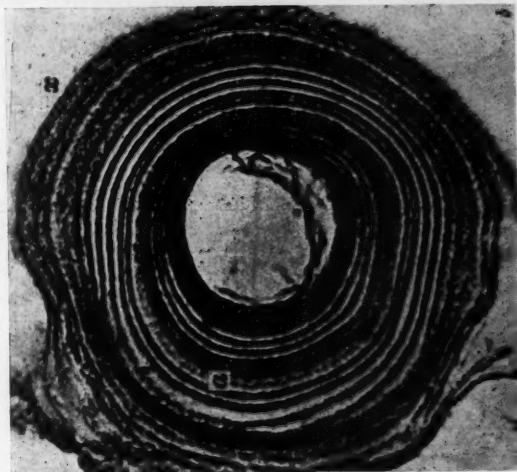


Abb. 7.
a Sekundärwand von Baumwolle (oben eine Verschiebungsfigur) (Frey-Wyssling),
b Querschnitt durch ein Baumwollhaar nach T. Kerr,
c Zellwand der Alge *Valonia* nach Preston u. Mitarbeiter.

Die Cellulose wird in der Sekundärwand in Form paralleler sublicht-mikroskopischer Stränge, den Fibrillen, in Form einer Faser- bzw. faser-ähnlichen Textur niedergelegt, wobei Schichten bzw. Lamellen gebildet werden. Vielfach wird noch eine feinere Unterteilung der Sekundärwand in äußere oder Außenschicht, Mittel- oder Zentralschicht und Innenschicht (= Tertiärlamelle) getroffen. In den Schichten bzw. Lamellen, deren es meist viele gibt (Baumwolle etwa 20 bis 30; vgl. Abb. 7b), umlaufen die zueinander parallel gelagerten Fibrillen (vgl. Abb. 7a) in verschiedenen Spiralwinkeln [47] die Faser, wobei verschiedene Schichten oftmals verschiedene Schraubendrehung zeigen.

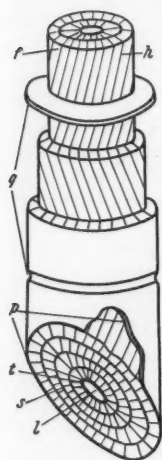


Abb. 8.

Faseraufbau
nach Lütke.

- p Primärwand,
- s lamellierte Sekundärwand,
- t Tertiärlamelle,
- l Lumen,
- f Fibrillen,
- h Hautsystem,
- q Querelemente.

Eine derartige Heterogenität in bezug auf die Orientierung der Celluloseketten wurde schon früh von Reimers und Steinbrinck ausgesprochen und konnte in der Folgezeit sowohl durch lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische sowie polarisationsoptische und röntgenoptische Methoden bewiesen werden. Somit ergibt sich als allgemeines Modell einer Sekundärwand, daß zueinander annähernd parallel und dicht gelagerte Fibrillen, in konzentrischen Lamellen angeordnet, in verschiedenen Spiralwinkeln die Faser umlaufen. Im allgemeinen zeigen die inneren Schichten steilere Umgänge, die äußeren flachere.

Aus verschiedenen Untersuchungen [49, 50] geht hervor, daß jede Lamelle aus einer einlagigen Aneinanderreihung von Fibrillen besteht. So gibt z. B. Kerr die Breite einer Lamelle im gequollenen Zustand mit 0,3 bis 0,4 μ an, das würde auf eine ungequollene Dicke von 0,2 bis 0,25 μ schließen lassen, denselben Wert, den Wergin für den Durchmesser einer Fibrille angibt. Viele Beobachtungen machen den Eindruck, daß parallele Micellstränge bzw. Fibrillen zunächst Bänder bilden, die dann erst schraubig um die Faserlängsachse gewickelt sind, ähnlich wie eine Gamasche [51].

Über das Zustandekommen von Lamellen gibt van Iterson [52] ein mechanistisches Modell: Die submikroskopische Struktur wird durch die Strömungsrichtung des Protoplasmas bedingt, das Appositionsschichten gerichtet niederlegt. In der Tat kann man z. B. bei der Bildung von Gefäßen beobachten, wie Plasmaströme kreisen und Ringe oder Spangen anlegen. Kreuzweise Schichtung wie z. B. in der Zellwand der Alge *Valonia* sei so zu erklären, daß das Protoplasma nach Niederlage einer Schicht gezwungen werde, seine Strömungsrichtung um etwa 90° zu ändern (vgl. auch J. R. Baker [48]).

Von Interesse in diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung von J. Sen und B. K. Banerjee [52a] an *Pinus longifolia*, daß die Celluloseorientierung durch enzymatische Hydrolyse (z. B. durch den Pilz *Lenzites striata*) verändert werden kann. Auch äußere Einflüsse, wie starker Druck (Preston) können eine Änderung in der Orientierung bewirken.

Zwischen den Lamellen wird von einigen Forschern eine substantielle Trennschicht vermutet; nach Lüdtké, Hess, Kerr u. a. Teile eines sogenannten Fremdhautsystems bzw. eine hydrophile Zementsubstanz von Pektincharakter (Abb. 8). Von Frey-Wyssling wird jedoch die Existenz solcher Hautsysteme mit Entschiedenheit in Abrede gestellt. Nach Bailey [53] können Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung oder wechselnde Porosität diese Lamellierung verursachen.

Nach Wieler [53 a], einem Vertreter der Fremdhauttheorie, baut sich die Sekundärwand wie folgt auf: „Die Bausteine der verdickten Membran sind kleine, mehr oder minder würfelförmige Hohlkörper, deren Inhalt mit einer anderen Substanz erfüllt ist als die, aus der die Hülle besteht. Sie lagern sich zu Reihen und Schichten zusammen und es entsteht so die nach Nägeli aus wasserärmeren und wasserreicheren Schichten bestehende Lamellierung der Zellwand. Die wasserreicheren Schichten sind der Inhalt der Bausteine, die durch radiale Wände voneinander getrennt sind, während die wasserärmeren Schichten die tangentialen Wände der Waben sind.“

Besonders eingehend ist die Struktur der Sekundärwand der Baumwolle untersucht. Balls [54] und Kerr [49] zeigten, daß die Sekundärwand aus etwa 20 bis 30 Lamellen besteht, die Balls als Tageswachstumsringe deutet. Genauere Beobachtung zeigte eine Differenzierung in eine kompakte Tageszone und eine poröse Nachtzone, so, wie der Jahresring der Bäume sich aus Frühjahrsholz und Herbstholz zusammensetzt. Als Beweis für diese Anschauung können die Wachstumsversuche von Anderson, Kerr und Morey [55] gelten, die bei konstanter Belichtung, Feuchtigkeit und Temperatur durchgeführt wurden. Die so erhaltenen Baumwollfasern zeigen in der Sekundärwand keine Wachstumsringe. Röntgenuntersuchungen lieferten keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein kristalliner Bereiche, so daß solche Cellulose als amorph angesehen werden muß; sie zeigt jedoch eine hohe Plastizität. Erst beim Strecken der Faser wird das Material kristallin, ebenso beim Behandeln mit unpolaren Lösungsmitteln [56]. Im Gegensatz dazu stehen ähnliche Versuche bei konstanter Belichtung von Barrows [57], denenzufolge unabhängig von den Versuchsbedingungen (auch bei konstanter Belichtung) Lamellen von etwa $1\ \mu$ Dicke entstehen. Der Befund bzw. die Annahme, daß durch den Einfluß von Wassermolekülen die parallelen Molekülketten nicht kristallisieren können (Berkeley und Kerr; Treitel) wirft die Frage auf, ob die Feinstruktur frischer, pflanzlicher Gewebe identisch ist mit der vorwiegend trocken untersuchter Gewebeteile. Zur Klärung dieser Frage untersuchten Preston, Wardrop und Nicolai [57 a] frische, nasse Fäden der Alge *Rhizoclonium* und das Cambialgewebe von *Pinus sylvestris*. In beiden Fällen konnten in den sehr störenden „Wasserhöfen“ einwandfrei Cellulose-röntgeninterferenzen erkannt werden, die bezüglich ihrer Lage (Orientierung) mit den klaren Röntgendiagrammen an den getrockneten Proben übereinstimmen. (Daß die Aufnahme nasser, hochgequollener Cellulose zufolge der geringen „Cellulosemasse“ im Röntgenstrahl und der erheblichen Wasserstreuung schwierig ist, lange Belichtung erfordert und zu schlecht auswertbaren Diagrammen führt, konnte auch in eigenen Versuchen an frischer, hochgequollener Regeneratcellulose wiederholt beobachtet werden.)

Von Franz [58] wurde die $150\text{--}200\ \mu$ dicke Sekundärwand der Kletterhaare des Hopfens untersucht. Innerhalb von 24 Stunden sollen hier bis zu 7 Lamellen

angelegt werden. In diesem Falle kann es sich nicht um Assimilationseffekte, d. h. um die Tagesschwankungen im Kohlehydratgehalt handeln, sondern um Wachstumsrhythmen anderer Art. Als solche wurden z. B. u. a. Ermüdungserscheinungen geltend gemacht.

Ob sich Fibrillen in beiden Ringzonen befinden, ist ungeklärt. Die Fibrillen sind nun schraubenartig angeordnet, und zwar so, daß der Windungssinn von Lamelle zu Lamelle wechselt. Aber auch innerhalb der einzelnen Lamellen selbst werden Umkehrungen beobachtet. Nach Hock, Ramsey und Harris [44] tritt an jeder Umkehrstelle in allen Lagen der Sekundärwand eine korrespondierende Umkehr, aber in entgegengesetzter Richtung, auf. Es wurde auch versucht, eine Relation aufzustellen zwischen der Spiralrichtung und der Tordierung der Baumwollfaser.

Der mittlere Steigungswinkel wird aus röntgenoptischen Daten zu $57/2$, d. i. $< 30^\circ$ gefunden. Wie Abb. 9 (nach Sisson) zeigt, besteht ein Zusammenhang zwischen der Fibrillenorientierung und der „Sichellänge“ im Röntgendiagramm. Es darf allerdings nicht übersehen werden, daß das übliche Röntgendiagramm die durchschnittliche Orientierung durch etwa einen Millimeter eines Schnittes von vielen tausend Fibrillen darstellt.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Schraubungswinkels zwischen Micelle und Faserachse beschreibt Heyn [59]. Nach dieser Methode ist der Winkel der sich überschneidenden Streulinien der Röntgenkleinwinkelstreuung der doppelte Winkel zwischen den Kristalliten und der Faserachse. Heyn erhielt für die Kokosfaser 45° , bei einigen Agaven $18-35^\circ$, bei *Sansevieria guineensis* $\sim 10^\circ$.

Einen rohen Anhaltspunkt über die Fibrillenorientierung im allgemeinen gibt eine Methode von Treitel [60], der Schnitte in flüssiger Luft einfriert und im gefrorenen Zustand zerschlägt. An Blattstengeln von *Nymphaea gladstonia* erhält man so irreguläre Bruchstücke, woraus der Autor schließt, daß die Cellulose weitgehend amorph vorliegt oder ein unorientiertes Netzwerk bildet, ähnlich einem isotropen Hydratcellulosefaden. Teile eines verholzten Zweiges von *Salix babyionia* liefern hingegen faserige Splitter.

Nach anderen Angaben findet sich in der Baumwolle ein mehr axial und ein tangential orientiertes Fibrillensystem. Die Annahme steht keineswegs im Widerspruch zu den Röntgendaten, da diese Kristallitlagen zwischen 0 und 30° zulassen. Rollins [30] z. B. findet unter der ersten Sekundärlamelle keine spiralförmige Struktur; die Fibrillen verlaufen mehr oder minder parallel zur Faserachse.

Anderson und Kerr [43] beobachteten in der Außenschicht eine dicke Fibrillenspirale mit einem Steigungswinkel von etwa 20 bis 30° . Diese „erste Lage der Sekundärwand“, wie sie benannt wurde, könnte nach den Autoren schließlich auch als innerste Schicht der Primärwand angesprochen werden, da sie sich vollständig beim Strecken oder Quellen von der Sekundärschicht ablöst und bei der reifen Faser von der Primärwand nur mit großen Schwierigkeiten abgetrennt werden kann. Sie scheint identisch zu sein mit der größeren „Spiralschicht“ von Hock, Ramsay und Harris.

Die Ramiefaser zeigt zufolge kräftigerer Strukturausbildung viele charakteristische Erscheinungen besser. Man sieht sehr deutlich die spiralförmige Anordnung der Fibrillen in den äußersten Wandschichten. Die Fibrillaren sind ziemlich achsenparallel geordnet; der mittlere Neigungswinkel der Schraubung mit der Längsachse ist kleiner als 12° .

Ähnliche Bilder ergeben sich bei Hanf, Flachs [30, 61] und Jute [62].

Im ersten Fall ist der mittlere Steigungswinkel $\sim 2^\circ$, beim Flachs $\sim 12^\circ$. (Charakteristisch für Hanffasern ist die periodische Folge von Querstreifen, Verschiebungen und knotenförmigen Auftreibungen.) Die Struktur solcher Bastfasern scheint aus gleichsinnig geschraubten Bändern aufgebaut zu werden. (Ausgesprochene Faserstruktur wurde am Wollgras gefunden; hingegen stehen in einem bestimmten Teil des Stengels der Jerichorose die Kristallite fast senkrecht zur Wachstumsrichtung, d. h. die Fibrillen verlaufen in äußerst flach liegenden Spiralen [63].) Chakrabarti und Nodder [63a] nehmen für die Fibrillen in der Jutefaser eine Z-Zwirnung, bei der Flachsfaser hingegen eine S-Zwirnung an.

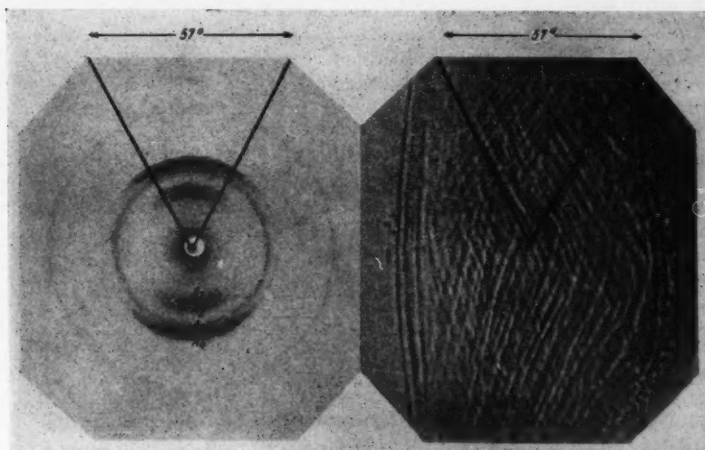


Abb. 9. Vergleich zwischen Röntgendiagramm und Fibrillenorientierung nach Sisson (links: Röntgendiagramm reifer Baumwollfaser, rechts: dieselbe schwach gequollen zur Sichtbarmachung der Fibrillenstruktur).

Auf Grund der Neigungswinkel kann man die Bastfasern in drei Gruppen einteilen: „Hanf“-Faser-, „Nessel“-Faser- und „Flachs“-Fasergruppe (Reimers). Davon besitzen die Fasern der Flachsgruppe gegenüber denen der beiden anderen den komplizierteren Bau der Sekundärwand (vgl. A. J. Turner [63b]). Dementsprechend findet Ullrich [64] in der Sekundärmembran von *Asclepias* und *Apocynum* drei Schichten, in denen die Fibrillen rechtsläufige und linksläufige Schraubung besitzen; die Struktur der inneren dritten Schicht ist noch unklar.

In einer neueren Untersuchung von Preston und Singh [65] wurde die Feinstruktur verschiedener Bambusfasern eingehend untersucht. Auch hier findet sich eine viellagige Sekundärwand. In der dünnen Außenschicht liegen die Fibrillen mit einem Steigungswinkel von etwa 35° . In den inneren Lagen der folgenden Mittelschicht nimmt der Winkel von 20° bis auf 10° ab. Diese Lagen sind durch dickere Fibrillen mit einem Spiralewinkel von 5 bis 6° getrennt. Diese Durchschnittswerte der Winkel variieren (wie bei der Baumwolle, Sisal und den Tracheiden) mit der Zelllänge, und zwar so, daß längere Zellen steilere Spiralen besitzen. An Sisalfasern

wurde eine dünne äußere Schicht von Fibrillen gefunden, die anders orientiert ist als die Hauptmasse in der Zellwand [65 a].

Das Mark von *Clematis* zeigt eine spiralgige Streifung von 45–50° [63].

Die äußerlich glatten, feinen und gleichmäßigen Fasern von Weizenstroh zeigen einen relativ stark axial orientierten Fibrillarbau. Das Bauprinzip der Faser dürfte ähnlich dem der Holzfasern sein [23].

Besonderes technisches Interesse beansprucht der Feinbau der Sklerenchymfasern des Holzes. Auch für die Holzfasern konnte ein lamellarer Bau der Sekundärwand nachgewiesen werden (siehe Abb. 2 b). Um die mangelhafte Druckfestigkeit der Fasertextur aufzuheben, wird die Holzfaser stark mit Lignin inkrustiert, so daß sich verholzte Zellwände wie armierter Beton verhalten, wobei — im Sinne des Frey-Wysslingschen Modells — die Fibrillen die zugfesten Stäbe und das Lignin das druckfeste Füllmaterial vorstellen. Wie im Elektronenmikroskop gezeigt werden konnte, werden erst durch das Herauslösen der inkrustierenden Substanzen die Fibrillen frei und geschmeidig.

Haas [66], der den morphologischen und chemischen Aufbau einer Reihe von Holzfasern (Aspe, Buche, Fichte) untersuchte, kommt zu dem Ergebnis, daß die Außenschicht der Sekundärwand aus Holzpolyosen besteht. Die Mittelschicht hat lamellaren Bau [67] und besteht aus Fibrillen. (Das Auftreten von Querspaltflächen wird einer Querspirale zugeschrieben. Vgl. S. 388.) Vielfach verlaufen die Fibrillen der äußeren bzw. inneren Schicht in flachen Spiralen, während in der mittleren die Fasern in steilen Spiralen in der Faserlängsrichtung angeordnet sind [68]. Nach einigen Forschern sind die Schraubungsrichtungen gegensinnig (vgl. auch Bucher [23]). Jaccard und Frey [68] führen die Überkreuzung auf den Fibrillenverlauf der hinteren Wand zurück. An aufgeschnittenen Tracheiden wurden folgende Spiralwinkel vermessen: *Pinus nigra* ~ 42–50°, *Pseudotsuga Douglasii* ~ 50°. An *Picea excelsa* konnte gezeigt werden, daß langsam wachsendes Holz steilere Spiralen (~ 58°) als rasch wachsendes (~ 70°) zeigt. Nach Freudenberg [69] soll jede Schicht eine etwas verschiedene Orientierung des Fibrillenlaufes besitzen; auch Bailey und Berkley finden, daß die Orientierung in den Koniferentracheiden von Schicht zu Schicht schwankt.

Nach den Untersuchungen von Bailey und Vestal, Wardrop und Preston sowie Preston [70] bestehen die Nadelholztracheiden aus drei Schichten, und zwar einer äußeren sowie inneren Schicht steiler gewundener Fibrillen mehr oder minder parallel zur Faserachse und einer Mittel- oder Zentralschicht flacherer Schraubung.

Die äußere und die Mittelschicht wurde von Preston und Wardrop [70 a] an *Pinus radiata* und *Pseudotsuga douglasii* in Abhängigkeit von der Zelllänge (bzw. des Jahresringes) der Tracheide eingehender untersucht. Es konnte eine empirische Beziehung zwischen der Länge L und dem Cotangens des Spiralwinkels θ gefunden werden. An Zellen des 10. Jahresringes wurden z. B. in beiden Schichten folgende Fibrillenorientierungen gemessen: *Pinus radiata*: Außenschicht 64°, Zentralschicht 20°; *Pseudotsuga douglasii*: Außenschicht 47°, Mittelschicht ~ 20°.

Die Mittelschicht der Nadelhölzer enthält Lignin, welches sich auf der Außenseite der Fibrillen befindet, während die Mittelschicht der Laubhölzer ligninfrei ist bzw. wesentlich geringere Mengen enthält (Haas).

Dolmetsch [71] schreibt über den Bau der Fichtenholzzeile: nach der Beendigung des Wachstums entstehen ligninreiche Kantenverdickungen in Form von Längleisten und die Ringwülste der Hoftüpfel werden aufgesetzt. Gleichzeitig erfolgt an der Innenseite der Primärwand die Ablagerung der äußeren Sekundärschicht von Fibrillenbündeln, die mit einem Winkel von etwa $30-40^\circ$ zur Faser ansteigen. Bei der Spätholztracheide folgt nach einer flachgängigen Außenspirale bald die Ausbildung eines zweiten, flachgängigen Spiralsystems mit 15 bis 35 konzentrischen Tagesschichten. Zwischen diesen Tagesringen sollen Pentosane abgelagert werden. Bailey beobachtete außer den konzentrischen Tagesringen noch eine radiale Differenzierung, die durch Unterschiede in der Porosität des Fibrillargefüges erklärt wird. In der Frühholztracheide ist nur die steile Fibrillenschicht ausgebildet.

Bucher und Widerkehr [23] konnten an Fichtentracheiden zwei Systeme gegensinnig gewundener Fibrillenverbände beobachten, wobei festgestellt werden konnte, daß die Fibrillenbündel am Faserende umkehren und in die Faser zurücklaufen. Die Schraubung der Fibrillen in den aufeinanderfolgenden Lamellen ist gleichsinnig. Die Umkehrung ist abgestuft, wodurch die Verjüngung der Faser zustande kommt. Flachschräubige Schichten konnten im Gegensatz zu Dolmetsch, Ritter, Chidester u. a. nicht beobachtet werden.

Nach Schramek umläuft in der Fichtenfaser ein Fibrillenband einen Kern geradeliegender Fibrillen. Daß von den Fasern bei geeigneter Behandlung sich zunächst Bänder abwickeln lassen, in denen parallel die Fibrillen liegen, konnte verschiedentlich beobachtet werden.

Von hohem wissenschaftlichem Interesse sind die Zellenwände der Grünalgen *Valonia*, *Halicystis* und *Cladophora* (Astbury, Preston, Nicolai u. a.). Erstere sind blasenähnliche Zellen, die in einigen Fällen einen Durchmesser bis zu 2 bzw. 3 cm erreichen können.

Die Cellulosekristallite liegen hier so, daß alle Kristallachsen zueinander parallel sind, d. h. es liegt eine natürliche höhere Orientierung vor [72]. Die Kristallite zweier Membranen, die außerordentlich dünn und an der Grenze der Sichtbarkeit sind, kreuzen sich unter einem Winkel von $60-80^\circ$. Die Richtung der Micellen bzw. der „Faserachsen“ derselben ist in den jeweils übernächsten Schichten gleich. Diese regelmäßige Schichtung (30 bis 40 Lagen), die ein gitterförmiges Muster ergibt, wird für die ganze Dicke innerhalb großer Bereiche der Zellwand ausgebildet gefunden [73]. Die Netzebenen mit einem Netzebenenabstand von $5,9 \text{ \AA}$ (A_1) liegen sämtlich tangential zur Lamellenoberfläche, jene mit dem Netzebenenabstand $\sim 5,4 \text{ \AA}$ (A_2) radial (vgl. Teil I). Auch neuere elektronenmikroskopische Studien [74] zeigen Fibrillen unbestimmter Länge mit einem Durchmesser von $\sim 300 \text{ \AA}$. Die Fibrillenordnung in benachbarten Lamellen verläuft unter einem Winkel, der zu etwa 80° gefunden wurde (Abb. 7 c). Die Cellulose in den Fibrillen besitzt eine hohe Dichte und ein hohes Maß von Kristallinität ($> 71\%$). (Über die Cellulosen der Meeresalgen siehe Percival und Ross [74 a].)

Für die Zellstoffkochung sind schließlich noch eine Reihe struktureller Diskontinuitäten von Interesse, wie Quer- und Schrägspalten, ring- und schraubenförmige Wandverdickungen und insbesondere Poren und Öffnungen in der Wand.

Die an den Tracheiden einiger Nadelhölzer sowie Gefäßen verschiedener Laubhölzer (z. B. Linde) beobachtbaren ring- oder schraubenförmigen Wandverstärkungen — die beim Auflösen des Zellstoffs als resistenter Partien oft isoliert zu beobachten

sind — zeigen starke Doppelbrechung und scheinen sehr dichte Strukturelemente zu sein.

Die Faserwandung kann ferner durch Poren und Tüpfel unterbrochen sein. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten zeigen, wie die Tüpfelschließhaut von zahlreichen Löchern durchbrochen ist. Die Porenplatte ist aus den gleichen Fibrillen wie die übrige Wand aufgebaut. Die Umgrenzung des Porenfeldes erfolgt durch tangential angeordnete Fibrillen. Durch die sichtbar gemachten Poren kommunizieren benachbarte Protoplasten mittels Plasmodesmen.

Welche Rolle die Tüpfel bei der Sulfitkochen spielen, zeigt der Aufschluß der Kiefer. Nach Untersuchungen von Kollmann befinden sich die die Tüpfel bildenden Organe im Splint- und Kernholz der Kiefer in einer anderen Zustandsform. Im Kernholz sind die Tüpfel durch den Torus fest verschlossen, während die Tüpfel im Splintholz geöffnet sind. Es wird hierdurch verständlich, daß sich Splint- und Kernholz bei der Kiefer beim Holzaufschluß auch anders verhalten müssen.

Die Tertiärlamelle

Die Innenschicht der Sekundärwand tritt vielfach als charakteristischer Strukturbestandteil hervor, so daß sie, obwohl zur Sekundärwand gehörig, zweckmäßig für sich beschrieben und als Tertiärlamelle bezeichnet wird.

Sie stellt als Abschlußwand gegen das Lumen gewissermaßen das morphologische Gegenstück zur Primärwand dar. Nach den Beobachtungen von Dippel ist sie auch nicht als letzte Appositionsschicht aufzufassen, nachdem die Tertiärlamelle schon zu einem früheren Zeitpunkt beobachtbar sein soll. Nachdem sie sehr fein entwickelt ist, entgeht sie leicht der Beobachtung und hat auch hierin eine gewisse Ähnlichkeit mit der Primärwand.

Nachdem die Lamelle gegen Cuoxam ziemlich widerstandsfähig ist, löst sie sich z. B. an delignierten Fichtenholzquerschnitten von der Sekundärwand. Man findet sie je nach Art der Zelle als feine Bänder oder als Schlauch im Inneren der gequollenen Faser. Während die Tertiärlamelle nach einigen Untersuchungen auch aus mehreren Lamellen bestehen und Cellulosefibrillen in irgendwelchen Schraubungen enthalten soll, stellt sie nach anderen Arbeiten ein feines, geschlossenes Häutchen dar, welches anscheinend weder aus Lignin noch möglicherweise aus Cellulose zu bestehen scheint. Nach Haas [66] gehen diese Substanzen bei der Hydrolyse und Acetylierung in schwer lösliche Verbindungen von der Art der Zuckerhumine über.

Nach Künemund [75] soll die Tertiärlamelle xylematischer Zellen aus Sprossen von *Salix alba* aus einem Mosaik viereckiger Patten bestehen.

Der Bau der Cellulosefibrillen

An einem reichen Untersuchungsmaterial konnte im vorigen Abschnitt gezeigt werden, daß die Zellwände aus Cellulosefibrillen aufgebaut werden, die zu verschiedenen Texturen angeordnet sind. Die Fibrille ist somit eine ausgeprägte, charakteristische Struktureinheit (Sisson). Die Fibrillen sind gemäß verschiedenen Angaben auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen 0,1 bis $1,4 \mu$ dick und von unbestimmter Länge. Abgesehen von den verschiedenen Dickenangaben unabhängiger Beobachter scheint die Existenz größerer und feinerer Fibrillen sehr wahrscheinlich. Die fibrillären Aufspaltungen der Schichten und Lamellen können im Lichtmikro-

skop nahe der Grenze der Auflösung nach der Mahlung (Abb. 10) oder Quellung beobachtet werden.

Daß die Fibrille als Struktureinheit uns entgegentritt, wird vielfach mit der Existenz differenzierender Häute in Zusammenhang gebracht.

Schon bei der Frage nach der Ursache der Lamellenbildung wurde erwähnt, daß eine Reihe von Forschern die Auffassung vertritt, daß die Lamellen durch eine sehr leicht quellbare Haut, wahrscheinlich von Pektincharakter², voneinander getrennt bzw. durch eine Kittsubstanz miteinander verkittet sind. Aber auch jede Fibrille soll durch ein solches Fremdhautsystem umhüllt sein, dessen Dicke jedoch kleiner ist, so daß bei der Quellung die Lamellen stärker aufspalten als die einzelnen Fibrillen untereinander. Von anderen Forschern wird die Existenz dieser mit derselben Entschiedenheit in Abrede gestellt. Die Differenzierung soll auf Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung, auf eine Porosität oder auf unterschiedlichen Wassergehalt beruhen. Eine Differenzierung und zugleich Zusammenhalt zwischen den Fibrillen soll durch Hemicellulose bewirkt werden, also gewissermaßen durch Unterschiede in Kettenlänge, Ordnungszustand und Fremdgruppengehalt. Auch Frey-Wyssling lehnt auf das entschiedenste die Existenz eines solchen Fremdhautsystems ab und vertrat mit Mühlethaler [76] längere Zeit hindurch die Auffassung, daß möglicherweise streng individualisierte bzw. definierte natürliche Bauelemente, wie Fibrillen, Mikrofibrillen, Micellarstränge etc., in der Zellwand nicht differenziert vorgebildet sind, sondern daß diese bereits als Zerfallsprodukte einer zusammenhängenden micellaren Struktur bei der Präparatherstellung aufzufassen seien. Gestützt schien die Auffassung einerseits durch die Tatsache, daß auch Kunstfasern mit steigender Orientierung immer besser in fibrilläre Teilchen aufspalten, andererseits durch den Umstand, daß im Elektronenmikroskop alle Übergänge vom feinsten Micellarstrang bis zur Fibrille sichtbar sind. Das Lichtmikroskop zeigt auf der anderen Seite vereinzelt sogar wieder größere Konglomerate, wie Fibrillenbänder, Makrofibrillen u. ä., so daß Elöd folgende Einteilung traf: Makrofibrillen (Durchmesser 15 bis 25 μ), Spindelstellen (5 μ) und Fibrillen (0,4 bis 0,8 μ). Barnes und Burton [77] konnten schließlich noch darlegen, daß eine Vielzahl „charakteristischer“ Einzelheiten von Fibrillen, Cellulosepartikeln etc., die auf Mikroaufnahmen gezeigt werden, Beugungseffekte und mechanische Effekte (Artefakte) darstellen.

Neben solchen Längsunterteilungen, wie sie durch mechanische Behandlung, durch Quellungsvorgänge etc. auftreten, werden auch — wie bereits erwähnt — die durch



Abb. 10. Aufspaltung gemahlener Fasern und Fibrillen nach Bucher.

² Dabei sollen Spuren von Kalzium eine Rolle spielen. Flachs z. B. zerfällt bei der Entfernung des Kalziums nach Behandlung mit Oxalaten.

Säurehydrolyse etc. entstehenden Querunterteilungen in Analogie als Zerfall in „vorgebildete Bauelemente“ gedeutet, die ähnlich durch Fremdhäute, Kittsubstanzen etc. differenziert sein sollen. Solche vorgebildete Teilchen werden von Wiesner (etwa $0,5 \mu$ lange Bruchstücke, die „Dermatosomen“), Wergin (Teilchen von 0,2 bis $0,25 \mu$ Länge bei der Quellung in Cuoxam) und Farr und Eckerson (Cellulosepartikeln $\sim 1 \times 1,5 \mu$) angenommen (vgl. Teil I). Auch Franz, Müller und Schiebold [78] nehmen eine Querunterteilung in Dermatosomen an, die jedoch mit kristallinen Bereichen gleichgesetzt werden. Die Verbindung in der Längsachse soll durch zwischenmolekulare Kräfte gleichgerichteter Ketten erfolgen. Die Größe der „Dermatosomen“ wird in Zusammenhang gebracht mit der Größenordnung der Wärmewellen bei 29°C und die Ausbildung von Mikrokristallen mit der Tendenz, bei möglichst tiefer potentieller Energie eine möglichst hohe Entropie zu besitzen.

Ähnlich diskutiert Haller (78a) die Bildung von „Dermatosomen“ bei der Säureeinwirkung; Haller findet dieselben eingebettet in einer gallertartigen Substanz, die der Zellulose sehr nahe steht und als chemisch modifizierte Kittsubstanz aufgefaßt wird.

Nach Dolmetsch [71] soll die Querunterteilung durch Spiralbänder, die eine Struktureigentümlichkeit der gesamten Faser darstellen (und die in dünne Spiralblätter unterteilt werden können), verursacht werden (Querspirale). Das Auftreten von Querspiral-Spaltflächen kann nach Haas [66] bedingt sein entweder durch Einlagerung rascher hydrolysierender Verbindungen zwischen den Gängen der Querspirale bzw. Spiralblätter oder durch schneller spaltende Bindungen (Lockerstellen) im Cellulosemolekül. Auch Lüdtkke (siehe Abb. 8) nimmt die Existenz von speziellen Querelementen an, die sich durch die gesamte Faser erstrecken.

Die Größe der Farrschen Cellulosepartikeln, die mit einer nichtkristallinen Substanz bedeckt sein sollen und die am jungen, wachsenden Baumwollhaar beobachtet wurden, läßt sich am schwersten unter Berücksichtigung der übrigen Makromolekül- und Zellwanddimensionen interpretieren. Preston wies auf die Schwierigkeit hin, Teilchen von etwa $1,1 \mu$ Durchmesser in Fibrillen anzunehmen, deren seitliche Dimension wie bei der Baumwolle nur $0,4 \mu$ oder weniger beträgt. Der Farrsche Cellulosekeim würde nach Bailey und Kerr mehr Platz einnehmen, als zwei Lamellen bzw. Tagesringe dick sind.

Ein weiterer Widerspruch, der sich z.B. in der Länge der verschiedentlich angenommenen Fibrillenbruchstücke und der aus dem DP-Wert errechneten Länge ergibt, wird von Farr [79] und Compton [80] z.B. dadurch ausgeschaltet, daß die Behauptung aufgestellt wird, die hohe Viskosität der Cuoxamlösung werde durch das Zementmaterial verursacht.

Daß nun durch Einwirkung siedender 2,5-n-Schwefelsäure tatsächlich ein „Herauslösen“ von Kristalliten aus der amorph-mesomorphen Umgebung erfolgt, konnte durch die Untersuchungen von Rånby und Ribí [81] nachgewiesen werden. Auch Erikson und Säverborn [82] nehmen an, daß die für Dermatosomen gehaltenen Bruchstücke durch eine außerordentliche Degradierung der Cellulose in den amorphen Bereichen gebildet werden, wodurch die Fibrillen schwach werden und brechen. Eine neue Untersuchung von Ribí [83] konnte zeigen, daß bei Viskoseseide die Fibrillen vielfach von einem amorphen Cellulosegel umhüllt werden. Beide Beobachtungen zeigen, daß weder für die Spaltung in Fibrillen noch für gelegentlich beobachtbare Querunterteilungen cellulosefremde Häute, Kittsubstanzen u.dgl. zur Erklärung herangezogen werden müssen.

In diesem Zusammenhang muß auch auf die Analogie zwischen der Werginschen Dermatosomenlänge von $\sim 2600 \text{ \AA}$ und der Länge von

500 Glukoseresten hingewiesen werden, nach denen gemäß den Untersuchungen von Schulz und Husemann [84] bevorzugt aufspaltende Bindungen eingebaut sein sollen. Wenn — wie im ersten Teil ausgeführt — alle diese Lockerstellen quer zur Fibrillenachse in einer Ebene angeordnet sind, ließe sich das Auftreten von Bruchstücken dieser Länge ohne Fremdhauthypothese verstehen. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten bisher keinen Anhaltspunkt für die Existenz solcher Häute erbringen (Eisenhut und Kuhn, Wuhrmann, Heuberger und Mühlethaler, Erikson und Säverborn, Mühlethaler).

Aus vergleichenden röntgenoptischen, polarisationsoptischen und mikroskopischen Studien an Zellwänden, insbesondere gewisser Grünalgen (vgl. S. 385), können Schlüsse über den micellaren Bau der Fibrille gezogen werden. Übereinstimmend kann festgestellt werden, daß die Celluloseketten parallel der Fibrillenlängsachse verlaufen. Wahrscheinlich sind in den einzelnen Fibrillen allgemein die Kristallite ziemlich perfekt dreidimensional (höher) orientiert. (Diese Anschauung wird auch durch elektronenmikroskopische Studien an Tunicin [Frey-Wyssling] erhärtet sowie durch Beobachtungen an den Fibrillen der Bakteriencellulose [Sisson]. Bei der ausgezeichnet höher orientierten Alge *Valonia* besitzen die Fibrillen — wie bereits erwähnt — die höchste Dichte und eine besonders hohe Kristallinität [$> 71\%$] [Preston].) Ob die amorph-mesomorphe Phase gleichmäßig über die Fibrille verteilt ist oder ob die Randbezirke einen höheren Gehalt aufweisen, ist derzeit noch ungeklärt. (In Anlehnung an Ribi [s. Seite 388] würde man geneigt sein letzteres anzunehmen.)

Eine weitere Klärung über den Bau der Fibrillen brachte das Elektronenmikroskop. Übereinstimmend wird eine weitere Aufspaltung in feinere Fibrillen beobachtet, die man mit Grund-, Elementar- oder Mikrofibrillen bezeichnet. Als erster wies Beischer auf die Tatsache hin, daß die etwa 0,1 bis $1,4 \mu$ dicke Fibrille ein Bündel von Mikrofibrillen darstellt, wovon jede einzelne nach Wergin 80 bis 100 Å dick sein soll.

Ruska und Kretschmer [85] fanden an Baumwolle, abgebaut mit Salzsäure, Mikrofibrillen bzw. Micellarstränge von etwa 50 Å Dicke. Ähnliche Beobachtungen machte Franz [86]. Kuhn [87] beschreibt Fibrillen von 100 bis 200 Å Durchmesser an mit Cuoxam behandelter Baumwolle. Hess, Kiessig und Gundermann [88] beobachteten bei der Trockenmahlung in der Schwingmühle von Zellstoff Fibrillen in der Dimension von 100 bis 750 Å. Eisenhut und Kuhn [89] finden 100 Å dicke Fibrillen, an Ramie solche von 200 Å. Berkley und Greathouse [90] finden an besonders präparierter Baumwolle rutenförmige Teilchen mit einem Durchmesser von 150 bis 200 Å und einer Länge von 10.000 bis 15.000 Å. Husemann [91] erhält an chemisch abgebauter Cellulose Micellarstränge von 60 Å Dicke; ebenso finden Wuhrmann, Heuberger und Mühlethaler [92] sowie Frey-Wyssling und Mühlethaler [76] Micellarstränge von 60 bis 70 Å Dicke bei der Ultraschallung von Fasern. Es werden dabei eine Reihe von Übergängen beobachtet. Bei der Naßmahlung von Fasern erhält Hermans [93] ebenfalls Fibrillen bis unter 100 Å im Durchmesser. Ähnliche Beobachtungen werden auch von Jentgen [94], Wallner [95], Barnes und Burton [77] u. a. mitgeteilt.

Eine neuere Arbeit von Kinsinger und Hock [96], in der elektronenmikroskopische Aufnahmen nach der Methode des Metallschattenverfahrens, des Oberflächenabdrucks sowie der „Kontrastfärbung“ von einer Reihe

natürlicher Fasern gemacht wurden, zeigte folgendes Ergebnis: Ramie spaltet in Mikrofibrillen von ~ 370 Å Dicke auf, Baumwollinters in solche von 160 Å, Stapelbaumwolle ~ 100 Å und Holzzellstoff 90–100 Å.

Aus diesen Arbeiten (vgl. Abb. 11 und 12), insbesondere aus der Untersuchung von Frey-Wyssling und Mühlethaler, scheint zunächst nicht klar ersichtlich zu sein, ob es sich bei den Mikrofibrillen um natürliche Strukturelemente handelt oder um Spaltstücke einer ausgedehnteren Faserstruktur, wie dies für Kunstseiden derzeit angenommen wird.

Die referierten Ergebnisse hängen ja sehr von der Art der angewandten Präparationsmethode ab, d. h. das übermolekulare Gefüge spricht zufolge seines komplizierten „Kohäsionsspektrums“ auf verschiedene Zerteilungsmethoden, wie Zerquetschen nach Quellung oder chemischer Hydrolyse, Angriff chemischer Agenzien (vor allem NO_2), Mahlen (insbesondere in der Kugelmühle oder Schwingmühle) und schließlich Zerteilung durch Ultraschall, in verschiedener Weise an.

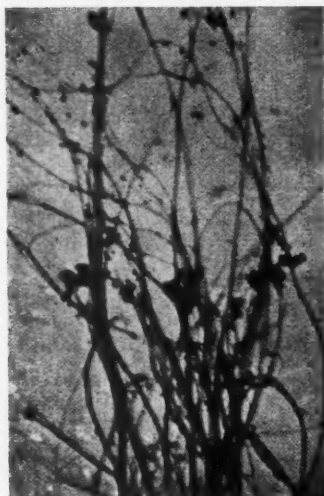


Abb. 11. Aufspaltung der Hanffaser in 200 Å dicke Mikrofibrillen. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mühlethaler.

Durch geeignete Zerkleinerungsmethoden ist es in den letzten Jahren Frey-Wyssling, Mühlethaler und Mitarbeitern gelungen, hinreichend dünne Fragmente mit ungestörtem Feinbau zu erhalten, die im Elektronenmikroskop erkennen ließen, daß sowohl die Mikrofibrillen der Primärwände wie auch die Mikrofibrillen in den sekundären Wandablagerungen einen auffallend konstanten Durchmesser von 250 bis 300 Å aufweisen. Auch die schonend hergestellten Präparate der vorhin genannten Autoren zeigen vielfach Mikrofibrillen einer analogen Dimension von etwa 200 Å. Somit scheint es sehr plausibel, daß definierte Mikrofibrillen von 200 bis 300 Å Dicke die Fibrille aufbauen. Nachdem die Lamelle der Sekundärwand der Baumwolle z. B. etwa $0,4 \mu$ dick ist, besteht eine Lamelle und somit die an der Grenze der lichtmikroskopischen Sichtbarkeit liegende Fibrille aus etwa 16 Mikrofibrillen. Auf den Durchmesser eines reifen Baumwollhaares kommen dann etwa 800 Mikrofibrillen. Auch die Fibrillen in der Zellwand der Alge *Valonia* (Abb. 7c) sind nach Preston und Mitarbeiter gleich wie die Fibrillen im Celluloseschleim von *Bacterium xylinum* (Abb. 5c) von analoger Dicke³.

därwand der Baumwolle z. B. etwa $0,4 \mu$ dick ist, besteht eine Lamelle und somit die an der Grenze der lichtmikroskopischen Sichtbarkeit liegende Fibrille aus etwa 16 Mikrofibrillen. Auf den Durchmesser eines reifen Baumwollhaares kommen dann etwa 800 Mikrofibrillen. Auch die Fibrillen in der Zellwand der Alge *Valonia* (Abb. 7c) sind nach Preston und Mitarbeiter gleich wie die Fibrillen im Celluloseschleim von *Bacterium xylinum* (Abb. 5c) von analoger Dicke³.

³ Anmerkung bei der Korrektur: In einer neueren Arbeit konnten Wyssling und Frey (Protoplasma 39, 656 [1951], auch im Tunicin elektronenmikroskopisch Mikrofibrillen von ~ 250 Å Durchmesser nachweisen. Die Fibrillen sind seitlich zu Bändern verschmolzen — offenbar unter der Wirkung nicht abgesättigter Oberflächen-

Mit dieser Feststellung hat sich Frey-Wyssling wieder zur Auffassung eines organisierten Aufbaues der Wände aus definierten und individualisierten Mikrofibrillen bekannt [29, 38].

Die Mikrofibrillen sind nach Frey-Wyssling nirgends miteinander verwachsen und somit individualisiert. Interessant ist die Frage, wie die Mikrofibrillen in den Membranen diese Individualität bewahren. Die Mikrofibrillen der Bakteriencellulose zeigen nämlich die Tendenz, miteinander zu verkleben und sich beim Eintrocknen zu verzwirren (siehe Abb. 5c). Es ist jedoch möglich, daß die hydrophilen Flächen bzw. die Gitterkräfte der Mikrofibrillen in den Membranen durch Begleitstoffe abgesättigt werden; dies würde jedoch der Vorstellung vom Vorhandensein einer Fremdhaut nahekommen (vgl. Fußnote).

Eine weitere Frage erhebt sich nun, worauf die Konstanz der seitlichen Dimension zurückzuführen ist. Nach Frey-Wyssling [97] spricht dies für eine Kontrollierung der Cellulosekristallisation durch das lebende Zytoplasma.

Während in bisherigen Untersuchungen an Kunstseiden immer festgestellt wurde, daß gröbere Stränge uneinheitlicher Dicke, die sich beliebig spalten, entstehen, konnte Ribi [83] durch schwache Beschallung eine sehr einheitliche Defibrillierung in „Elementarfibrillen“ mit einem Durchmesser von 70 bis 80 Å erreichen. Die Dimension stimmt sowohl mit der Dicke der Micellen als auch mit „Elementarfibrillen“, die bei derselben Beschallung von Ribi an Baumwolle erhalten wurden (74 Å), gut überein. Es scheint daher, daß die Unterschiede im Feinbau zwischen nativen und künstlichen Cellulosefasern viel kleiner sind, als bisher angenommen wurde. Eine Reihe von Besonderheiten, für die man bisher biologische Faktoren als Erklärung heranzog, dürften sich auch aus physikalisch-chemischen Gegebenheiten erklären lassen.

Nachdem aus bisherigen Micellbreitenmessungen die obere Grenze der Kristallite bei etwa 146 Å (Heyn) angenommen werden darf, muß die Frey-Wysslingsche Mikrofibrille ihrerseits wieder ein Bündel aus Micellarsträngen darstellen (Kratky; vgl. auch Teil I). Auch Wardrop [33a] faßt die Mikrofibrillen als supermicellare Gebilde auf. Für diese Auffassung spricht schließlich auch die Tatsache, daß bei vielen Aufspaltungsverfahren

kräfte —, wodurch eine Ringfaserstruktur zustande kommt. Die Manteldecke stellt somit ein gekreuztes System gegenseitig durchflochtener Fibrillenbänder dar.

Im Einklang damit stehen auch eigene röntgenoptische Untersuchungen an mercerisiertem Tunicin. Beim Mercerisieren bleibt im Gegensatz zur Herabsetzung des Orientierungsgrades bei (ungespannter) Baumwolle, Ramie u. dgl. die Ringfaserstruktur völlig erhalten. An diesen höher orientierten, mercerisierten Präparaten sind ebenfalls zwei Kristallitlagen erkennbar.

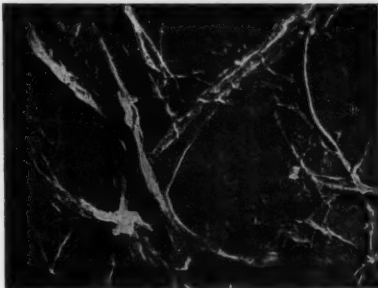


Abb. 12. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrofibrillen eines Zellstoffes nach der Metallschattenmethode (beschattet mit Chrom unter 45°) (Kinsinger und Hock).

wiederholt Auffaserungen bis herab zur Micelldimension (60 bis 80 Å) beobachtet wurden⁴).

Zum Schluß sei noch auf eine Arbeit von Staudinger und Mitarbeiter [98] hingewiesen, in der Unterschiede hinsichtlich der Löslichkeit der Cellulose von Flachs und Baumwolle bzw. Ramie festgestellt wurden. Die Autoren werfen die Frage auf, ob nicht Cellulose ein Sammelbegriff für ein Polysaccharid ist, das sich im wesentlichen aus β -glukosidisch gebundenen Glukoseresten aufbaut, daß aber zwischen den Cellulosen der verschiedenen Pflanzen noch feinere Unterschiede im Aufbau bestehen. Es wäre denkbar, daß jede Pflanzenart eine ihr eigentümliche Cellulose aufbaut bzw. eine Cellulose mit individuell verteilten Lockerstellen.

Zusammenfassend darf man aus dem vorgelegten Material wohl den Schluß ziehen, daß sehr lange Celluloseketten in bestimmten Bereichen zu einem Kristallit zusammentreten. Neben solchen, mehr oder minder unvollkommenen Kristalliten (Micellen) liegen auch amorphe Bereiche vor. Die Micellen dürften dem Fransenmodell entsprechen; die Fransen stellen den Übergang vom kristallinen Bereich zum amorphen Bezirk dar und werden aus Molekülketten gebildet, die, durch den amorphen Anteil hindurchgehend, in anderen Micellen ihre Fortsetzung finden können (durchlaufende Hauptvalenzketten). Eine solche Aneinanderreihung mehr oder minder vollkommen kristallisierter Bereiche in Richtung der Längserstreckung, getrennt durch stark gittergestörte und amorphe Bezirke, dürfte das Bild eines Micellarstranges sein. Mehrere Micellarstränge, seitlich schwächer verknüpft durch vereinzelte, verbindende Celluloseketten (parakristalline Cellulosefäden nach Frey-Wyssling), amorphe Anteile und unabgesättigte Gitterkräfte, mehr oder minder differenziert durch intermicellare Spalten, bilden die Mikrofibrille (Abb. 5, Teil I). Bündel von Mikrofibrillen mit wahrscheinlich stärker abgesättigten Gitterkräften und offenbar weit schwächerem gegenseitigen Zusammenhalt als die Micellarstränge in der Mikrofibrille stellen die Fibrillen dar, die durch Hemicellulosen, Dichteschwankungen, amorphe Cellulosegele u. dgl. ihrerseits wieder voneinander differenziert sind.

Die Fibrillen können einzeln oder zu Bündern vereinigt nun in verschiedenen Texturen die Zellwände aufbauen. Charakteristisch für die Sekundärwand ist das Auftreten von Lamellen aus einlagigen, parallelen Fibrillenreihen, die in verschiedenen Steigungen rechts oder links windend die

⁴ Anmerkung bei der Korrektur: In einer neueren Arbeit vertritt nunmehr auch Frey-Wyssling („Über den inneren Aufbau der Cellulosemikrofibrillen“, makrom. Chem. 6 [Staudinger-Festband], 7 [1951]) die Ansicht, daß die von ihm beobachtete Mikrofibrille mehrere — und zwar unter Zugrundelegung eines Mikrofibrillenquerschnittes von $\sim 6,2 \cdot 10^4 \text{ Å}^2$ und einer Strangdicke von $\sim 60\text{--}70 \text{ Å}$ — 15–25 Micellarstränge umfaßt. Daß sich die Mikrofibrille kaum in ihrer ganzen Länge aufspalten, sondern nur zu kleineren Strängen „auffransen“ läßt, wird durch die seitliche Verbindung mit parakristallinen Cellulose-„fäden“ erklärt (vgl. Teil I). Die bei verschiedenen Eingriffen (z. B. Hydrolyse nach Nickerson, Mark, Hermans, Rånby und Ribí) beobachtbare Querteilung, die zur Auffassung von Dermatosomen etc. führte, wird darauf zurückgeführt, daß submikroskopische Partien (Segmente) durch amikroskopische Inhomogenitäten getrennt sind. Als letztere kommen strukturell aufgelockerte Querebenen, hydrolysefähige Querebenen u. dgl. in annähernd gleicher Höhe in Frage (vgl. Teil I).

Faserachse umlaufen können. Die Primärwand stellt im Gegensatz dazu nach neueren Untersuchungen von Frey-Wyssling ein submikroskopisches Geflecht aus Mikrofibrillen dar.

Zum Schluß danke ich für das fördernde Interesse an dieser Arbeit dem Institutsvorstand, Herrn Prof. Dr. O. Kratky, dem Direktor des Pflanzenphysiologischen Instituts, Herrn Prof. Dr. F. Weber, sowie der Zellwolle Lenzing AG. und der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung. Den beiden Erstgenannten bin ich ferner für anregende Diskussionen und teilweise Bereitstellung der umfangreichen Literatur zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

- [1] Protoplasma 40, 166 (1951).
- [2] C. Wehmer: Die Pflanzenstoffe, 2. Aufl. Jena 1951; J. v. Wiesner: Die Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig 1921; A. Koelsch: Floristische Lebensbilder, Bd. 3. Stuttgart 1912; K. Linsbauer: Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. IV, Die Pflanzenhaare. Berlin 1932; A. Matthews, The Textile Fibres. New York 1924.
- [3] Wittmack: Botanik und Kultur der Baumwolle, in O. Herzog, Technologie der Textilfasern. Berlin 1928.
- [4] A. P. Sakostschikoff u. G. A. Korsheniovsky: Faserforschung 9, 249 (1952).
- [5] R. Haller: Ber. schweiz. bot. Ges. 53, 84 (1945); B. Lee u. J. H. Priestley: Ann. Bot. 58, 525 (1924).
- [6] R. F. Nickerson in E. Ott: Cellulose and Cellulose Derivatives. New York 1946.
- [7] A. Frey-Wyssling: Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives. New York 1948.
- [8] W. Wergin: Planta 50, 800 (1940).
- [9] L. M. Rollins: Text. Res. J. 15, 65 (1945); Botan. Gazz. 108, 495 (1947); R. F. Nickerson: Ind. Engng. Chem. 32, 1454 (1940); C. W. Hock, in W. Seifriz: The Structure of Protoplasm. Iowa State Coll. Press 1942; E. Ott, Cellulose and Cellulose Derivatives. New York 1946.
- [10] T. Kerr u. J. W. Bailey: J. Arnold Arb. 15, 327 (1934); siehe auch: A. Frey-Wyssling: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen, S. 96, 1935.
- [11] A. Gurwitsch: Protoplasma 6, 449 (1929).
- [12] M. Lüdtke: Protoplasma 22, 457 (1935).
- [13] A. Frey-Wyssling: Arch. Klaus-Stift. 20, Erg.-Bd., 381 (1945); F. Blank u. A. Frey-Wyssling: Ber. schweiz. Bot. Ges. 51, 116 (1941); Ann. Bot. London 8, 71 (1944); P. Wirth: Ber. schweiz. Bot. Ges. 56, 175 (1946).
- [14] Möglicherweise Kondensationswasser, herrührend von der Bildung hochpolymerer Moleküle aus niedermolekularen Zuckern.
- [15] W. A. Becker: Acta Soc. Bot. Polon. 11, 159, 190 (1934); Z. Zellforschung 23, 253.
- [16] W. A. Becker: Acta Soc. Bot. Polon. 9, 381 (1932); K. Belar: Z. Zellforschung 10, 73 (1929).
- [17] J. H. Priestley: New Phytologist 28, 454 (1929).
- [18] I. W. Bailey: Amer. J. Botany 10, 499 (1923); L. W. Sharp: Introduction of Cytology, 3. Aufl. New York 1934.
- [19] H. W. Harlow: New York State College For. Tech. Pub. 21 (1927).
- [20] F. Ehrlich, Cellulosechemie 11, 161 (1930).

- [21] M. Lüttke, *Biochem. Zeitschr.* 233, 1 (1931).
- [22] G. Jayme u. M. Harges-Steinhäuser, *Holzforschung* 1, 33 (1947).
- [23] H. Bucher u. L. P. Widerkehr-Scherb: *Morphologie und Struktur von Holzfaser. Attisholz* 1947.
- [24] W. M. Harlow: *Paper Trade J.* 112, 31 (1941).
- [25] O. Eisenhut u. E. Kuhn: *Angew. Chem.* 55, 198 (1942).
- [26] O. Dischendorfer: *Angew. Botanik* 7, 57 (1925).
- [27] W. Wergin, *Planta* 26, 751 (1937).
- [28] Schneider: *Faserforschung* 13, 121 (1938).
- [29] A. Frey-Wyssling u. K. Mühlethaler: *Schweiz. Bauztg.* 67 (1949).
- [50] L. M. Rollins: *Text. Research J.* 15, 65 (1945).
- [31] R. M. Tupper-Carey u. J. H. Priestley: *Proc. Roy. Soc. (London)* 95 (1923); vgl. ferner: E. Nicolai u. A. Frey-Wyssling: *Protoplasma* 40, 401 (1938).
- [32] J. Gundermann, W. Wergin u. K. Hess: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 70, 517 (1937).
- [33] A. Frey-Wyssling: *Ber. schweiz. Bot. Ges.* 59, 5 (1949); A. Frey-Wyssling, in *Fortschritte d. Botanik*, Bd. XII, von E. Gäumann u. O. Renner. Springer-Verlag 1949.
- [33a] A. B. Wardrop, *Nature* 164, 366 (1949).
- [33b] L. E. Hessler, G. V. Merola u. E. E. Berkley, *Text. Res. J.* 18, 628 (1948).
- [33c] R. D. Preston u. A. B. Wardrop, *Biochim. Biophysic. Acta* 3, 549 (1949).
- [34] K. Hess, W. Wergin u. H. Kiessig: *Planta* 33, 151 (1942).
- [35] K. Hess, H. Kiessig, W. Wergin u. W. Engel: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 72, 642 (1939).
- [36] K. u. M. Wuhrmann-Meyer: *J. wiss. Bot.* 87, 642 (1939).
- [37] I. Elvers: *Svensk bot. Tidskr.* 37, 331 (1943).
- [38] A. Frey-Wyssling: *Vakbl. biolog. (Nd)* 27, 89 (1947); *Vjschr. naturf. Ges. Zürich* 93, 24 (1948); *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives*. New York 1948; *Ber. schweiz. Bot. Ges.* 59, 5 (1949); *Fortschritte der Botanik*, Bd. XII, von E. Gäumann u. O. Renner. Springer-Verlag 1949.
- [39] K. Mühlethaler: *Biochim. Biophys. Acta* (1949).
- [40] Vgl. ferner auch: A. Frey-Wyssling, *Protoplasma* 25, 262 (1936); A. N. J. Heyn: *Diss. Utrecht*; H. Söding: *J. wiss. Bot.* 74, 127 (1931); C. Zolliker: *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 53, 152 (1931).
- [41] K. Wuhrmann: *Diss. E. T. H. Zürich* 1937.
- [42] E. Ott: *Cellulose and Cellulose Derivatives*, 2. Aufl. New York 1946; E. Heuser: *The Chemistry of Cellulose*, 3. Aufl. New York 1947.
- [43] D. B. Anderson u. T. Kerr: *Ind. Eng. Chem.* 30, 48 (1938).
- [44] C. W. Hock, R. C. Ramsay u. M. Harris: *J. Research Nat. Bur. Standards* 26, 93, R. P. 1362 (1941).
- [45] A. Frey-Wyssling: *Ber. schweiz. Bot. Ges.* 49, 5 (1949).
- [46] A. Wier: *Protoplasma* 37, 171 (1943).
- [47] D. R. Morrey: *Text. Res. J.* 4, 491 (1934).
- [48] J. R. Baker: *Nature (London)* 165, 585 (1950).
- [49] T. H. Kerr: *Protoplasma* 27, 229 (1937).
- [50] W. Wergin: *Protoplasma* 32, 116 (1939); *Naturwiss.* 26, 613 (1938).
- [51] Vgl. W. Schramek: *Cellulosechem.* 20, 38 (1942).
- [52] G. van Iterson: *Chem. Weekbl.* 24, 166 (1927); *Protoplasma* 27, 190 (1937).
- [52a] J. Sen u. B. V. Banerjee: *Science (New York)* 111, 151 (1950).
- [53] J. W. Bailey u. Mitarbeiter: *Ind. Eng. Chem.* 30, 40 (1938).

- [54] W. L. Balls: *Proceed. Roy. Soc. London (B)* 90, 542 (1919).
- [55] D. B. Anderson u. D. R. Morrey: *Am. J. Bot.* 24, 503 (1937); D. B. Anderson u. T. H. Kerr: *Ind. Eng. Chem.* 30, 48 (1938).
- [56] E. Berkley u. T. Kerr: *Ind. Eng. Chem.* 38, 304 (1946).
- [57] L. F. Barrows: *Contr. Boyce Tomps. Inst.* 11, 161 (1940).
- [57a] R. D. Preston, A. B. Wardrop u. E. Nicolai: *Nature (London)* 162, 937 (1948).
- [58] H. Franz: *Flora* 29, 287 (1934).
- [59] H. N. J. Heyn: *Text. Res. J.* 19, 163 (1949); *J. Amer. chem. Soc.* 70, 3138 (1948).
- [60] O. Treitel: *J. Colloid. Science* 2, 237 (1947).
- [61] Vgl. C. R. Nodder: *J. Text. Inst.* 13, 161 (1922); D. B. Anderson: *Am. J. Bot.* 14, 187 (1927).
- [62] R. D. Preston: *Proceed. Roy. Soc. London (B)* 130, 130 (1941).
- [63] Vgl. H. W. Gonell u. O. Kratky, in *Handbuch d. physik. techn. Mechanik IV/2* von F. Auerbach u. W. Hort. Leipzig 1931.
- [63a] B. K. Chakrabarti u. C. R. Nodder: *Nature (London)* 163, 19 (1949).
- [63b] A. J. Turner: *J. Text. Inst.* 40, 857, 972 (1949).
- [64] J. Ullrich: *Ber. dtsch. Bot. Ges.* 63, 100 (1950).
- [65] R. D. Preston u. K. Singh: *J. Experimental Botany* 1, 214 (1950).
- [65a] R. D. Preston u. M. Middlebrook: *J. Text. Inst.* 40 T, 715 (1949).
- [66] H. Haas: *Makromol. Chemie* 3 117 (1949).
- [67] H. F. Mark: *Tappi* 32, 108 (1949).
- [68] P. Jaccard u. A. Frey: *Jb. Bot.* 68, 844 (1928); E. E. Berkley u. O. C. Woodyard: *Text. Res. J.* 18, 519 (1948).
- [69] K. Freudenberg: *Papierfabrikant* 30, 189 (1932).
- [70] R. D. Preston: *Proc. Leeds Philos. Soc.* 3, 546 (1939); J. W. Bailey u. M. R. Vestal, *J. Arnold Arboretum* 18, 186 (1947); A. B. Wardrop u. R. D. Preston: *Nature (London)* 160, 911 (1947).
- [70a] R. D. Preston u. A. B. Wardrop: *Biochim. Biophysica Acta* 3, 585 (1949).
- [71] H. Dolmetsch: *Kolloid-Z.* 108, 183 (1944).
- [72] O. L. Sponsler, *Protoplasma* 12, 2 (1931); R. D. Preston, W. T. Astbury: *Proc. Roy. Soc. London (B)* 122, 76 (1937); W. A. Sisson: *Contr. Boyce Thomps. Inst.* 12, 171 (1941).
- [73] W. T. Astbury, C. T. Marwick u. J. D. Bernal: *Proc. Roy. Soc. London (B)* 109, 443 (1932).
- [74] R. D. Preston, E. Nicolai, R. Reed u. A. Millard: *Nature* 162, 665 (1948).
- [74a] E. G. V. Percival u. A. G. Ross: *Nature (London)* 162, 895 (1948).
- [75] A. Kühnemund: *Botan. Archiv* 34, 462 (1932).
- [76] A. Frey-Wyssling u. K. Mühlethaler: *Text. Res. J.* 17, 32 (1947).
- [77] R. Barnes u. C. J. Burton: *Ind. Eng. Chem.* 35, 120 (1943).
- [78] E. Franz, F. H. Müller u. E. Schiebold: *Kolloid-Z.* 108, 233 (1944).
- [78a] R. Haller: *Schweiz. Arch. angew. Wiss. Techn.* 14, 365 (1948).
- [79] W. K. Farr: *Contr. Boyce Thomps. Inst.* 10, 71 (1938).
- [80] I. Compton: *Contr. Boyce Thomps. Inst.* 10, 57 (1938).
- [81] B. G. Rånby u. E. Ribí: *Experientia* 6, 12 (1950).
- [82] B. Erikson u. S. Säverborn: *Acta Aricult. Suecana* 16, 234 (1946).
- [83] E. Ribí: *Arkiv Kemi* 2, 331 (1950).
- [84] G. Schulz u. E. Husemann: *Zeitschr. physik. Chemie (B)* 52, 23 (1942).
- [85] H. Ruska u. M. Kretschmer: *Kolloid-Z.* 93, 163 (1940).
- [86] E. Franz: *Angew. Chemie* 56, 113 (1943).
- [87] E. Kuhn: *Melliand. Text. Ber.* 22, 249 (1941).

- [88] K. Hess, H. Kiessig u. J. Gundermann: *Zeitschr. physik. Chemie (B)* **49**, 64 (1941).
- [89] O. Eisenhut u. E. Kuhn: *Angew. Chemie* **55**, 198 (1942).
- [90] Zitiert in: G. R. Sears u. E. A. Kregel: *Paper Trade J.* **114**, T. 45 (1942).
- [91] E. Husemann: *J. makrom. Chemie* **1**, 16 (1945).
- [92] K. Wuhrmann, A. Heuberger u. K. Mühlethaler: *Experientia* **2**, 105 (1946).
- [93] P. H. Hermans: *Text. Res. J.* **16**, 545 (1946).
- [94] H. Jentgen: *Kunstseide* **23**, 76 (1941).
- [95] L. Wallner: *Melliand Text. Ber.* **23**, 158 (1942).
- [96] W. G. Kinsinger u. C. W. Hock: *Ind. Eng. Chem.* **40**, 1711 (1948).
- [97] A. Frey-Wyssling, K. Mühlethaler u. R. W. G. Wyckoff: *Experientia* **4**, 475 (1948).
- [98] H. Staudinger, P. Herrbach u. H. Stock: *Makrom. Chem.* **1**, 60 (1947); vgl. auch A. Sippel: *Z. Elektrochem.* **50**, 256 (1944).

Kurze Mitteilung

Über die Tüpfel von *Ceramium*

Von

Maria Hütter-Kanert, Gießen

Mit 6 Textabbildungen

(Eingelangt am 24. März 1951)

Die weitlumigen Zellen der *Ceramium*-Fäden haben schon vielen Zyto-morphologen Stoff zu Untersuchungen gegeben: zugleich durch ihre longitudinal verlaufenden, sehr derben Protoplasmastränge (vgl. Lanz 1940; Küster 1951), wie durch die Tüpfel, welche benachbarte Zellen miteinander verbinden und nicht nur durch ihre Größe, sondern auch durch die eigenartigen Verschlussplatten, die in den Tüpfelhohlräumen liegen, die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt haben (Jungers 1933; Kylin 1937; Mühl-dorf 1937; Celan 1939; Küster (1951a, 126). Die Verschlussplatten haben Mangenot (1924), Miranda (1930) und Küster (1951, 118) mit zahl-reichen von Objekten verschiedener Art wohlbekannten Plasmadegenerationen verglichen; Küster hat darauf hingewiesen, daß gerade in Tüpfeln und anderen Stellen, welche den Plasmaleib stark einengen, Degenerations-erscheinungen häufig sind, und hat bei der Beschreibung der für *Codium* bekannten Erscheinungen darauf aufmerksam gemacht, daß auch bei diesem die Degeneration des Plasmas neben trüben, stark körnigen, glasklare Produkte entstehen lassen kann, die mit den für *Ceramium* und andere Rot-algen bekannten Verschlussplatten verglichen werden dürfen.

Die Beobachtungen, über die ich hier berichte, wurden an Material von *Ceramium rubrum* (Jänner bis März 1951) angestellt, das mir die Biologische Anstalt zu List (auf Insel Sylt) wiederholt zu senden die Güte hatte.

Meine Beobachtungen über die in den Tüpfeln liegenden Verschluss-platten wurden von mir ohne Fixierung am lebenden Material ausgeführt; ihre Ergebnisse stimmen mit den von Jungers (1942) mitgeteilten (der an fixiertem und gefärbtem Material arbeitete) nicht in allen Punkten überein. Da das mir erreichbare Wintermaterial vielleicht nicht durchweg zur Bearbeitung der Frage ausreichte, ich andererseits meine Befunde nicht unerwähnt lassen möchte, darf ich die nachfolgenden kurzen Angaben hier einschalten.

Viel deutlicher und häufiger als an den großen Tüpfeln, welche benachbarte, axiale Zellen miteinander verbinden, habe ich an den kleineren, welche zwischen jenen und den Berindungszellen liegen, fast überall einen aus zwei gewölbten Platten bestehenden Verschlussapparat wahrnehmen können. Die Platten sind oft einander gleich und liefern zu zweien ein Bild, das dem der zweiteiligen Pyrenoide (*Tetraspora* — vgl. Geitler 1926; Küster 1951a, Fig. 164c) einigermaßen ähnlich ist. Das System wird insofern asymmetrisch (bezogen auf die Ebene der Tüpfelschließhaut oder Zellgrenze), als die beiden Platten ungleich groß oder ungleich stark gewölbt sein können; wenn sie gegeneinander verschoben erscheinen, so handelt es sich um eine ungewollte Wirkung der Präparation. Der Abstand der beiden Platten voneinander ist meist gering, zuweilen aber so erheblich, daß der Durchmesser des ganzen Apparates von seiner Höhe (Richtung des Tüpfelkanals) übertroffen wird. — Die Platten färben sich mit Rutheniumrot stark.

Die Tüpfel, die die axialen Zellen miteinander verbinden, sind mit großen

Platten ausgestattet — ebenen oder gewölbten. Auffallend erschien mir die Verstärkung der Ränder zu einem derben Ring, der ringsum gleich dick oder nur einseitig kräftig entwickelt ist. Zuweilen ließ sich erst durch Färbung (Rutheniumrot) die Gewißheit gewinnen, daß im Innern des Ringes eine zarte farblose Haut gespannt war. Die von gleichmäßigem Rund abweichenden Ausbildungen der Ringe kommen möglicherweise durch lokale Lösung der Ring- oder Platten-substanz zustande.

Schließlich möchte ich noch einige schwer deutbare Erscheinungen erwähnen, die ich an mit Rutheniumrot gefärbten Verschlussplatten gemacht habe. Man

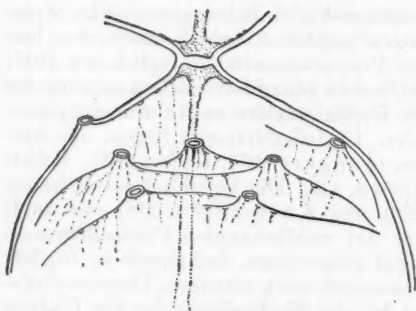


Abb. 1. Hälfte einer bloßgelegten Axialzelle (*Ceranium rubrum*), die mit den benachbarten Rindenzellen durch zahlreiche Tüpfel verbunden ist; das Plasma liegt seiner Membran nur noch an den Tüpfeln an; um jeden Tüpfel liegen in radialer Anordnung die fadendünnen Plastiden.

Da die weitlumigen Zellen, die der Längsaxe des *Ceranium*-Thallus folgen, nicht nur untereinander durch geräumige Tüpfel verbunden sind, sondern auch mit den anliegenden Rindenzellen, kann man auf wohl gelungenen Präparaten, die die Oberfläche der Axialzellen bloßlegen, eine Vielzahl von Tüpfeln der Beobachtung zugänglich finden (Abb. 1); ich erhielt befriedigende Präparate nicht selten dadurch, daß ich von den Fäden die Rindenschicht abschabte. In der Figur sind an den dem Beschauer zugewandten Teilen der Wand sieben Tüpfel erkennbar: das kontrahierte Plasma bringt die Stellen, an welchen es in die Tüpfelhohlräume der Membran hineinreicht, durch kraterartige Erhebungen gut zum Ausdruck.

Überraschend ist das Flächenbild der getüpfelten Membran. In der Mehrzahl der Fälle ist jeder Tüpfel — sowohl die zentral gelegenen als die zu den Rindenzellen führenden — von einem kreisrunden Hof umgeben. Mitunter weist der Tüpfel ovale Form auf; in diesen Fällen nimmt auch der Umriß des Hofes diese an (Abb. 2). Ich glaube, daß die mit diesem Hof zum Ausdruck kommende ungewöhnliche Membranstruktur unsere Beachtung verdient und die nachfolgende Schilderung rechtfertigt.

Die Grenze zwischen dem Hof und seiner Umgebung ist meist scharf. Über die Größenverhältnisse gibt Abb. 2 Aufschluß; der dargestellte Tüpfel mißt 10 und 50 μ im kürzesten und längsten Durchmesser, der Hof 48 und 82,5 μ .

sieht zuweilen um diese einen schmalen, krümeligen Rand einer Substanz sich entwickeln, die färberisch mit den Verschlussplatten übereinzustimmen scheint. Vielleicht liegt hier eine rhythmische Niederschlagung der Degenerationsmasse vor; zu dieser Vermutung sehe ich mich durch eine Mitteilung Küsters (1951b) ermutigt, der für *Cucurbita* wurzeln einen rhythmischen Niederschlag der Kallusmassen nachweisen konnte; dem Genannten lag offenbar ein Objekt mit besonders üppiger Kallusentwicklung vor.

Unsere Aufmerksamkeit soll vornehmlich den tüpfeltragenden Membranen gelten, die — wie mir scheint — bisher in der Literatur noch nicht behandelt worden sind.

Wir wissen von anderen Fällen her, daß ein Tüpfel und seine Umgebung sich durch abweichende Feinstruktur von den benachbarten Teilen der Wand unterscheiden kann; ich verweise insbesondere auf das, was Frey-Wyssling (1940) über den micellaren Feinbau der Hoftüpfel und der ihn umgebenden Teile der Tracheidenwand mitgeteilt hat (vgl. auch Küster 1951b).

Es ist schwer zu sagen, wodurch sich der Hof unserer Membranen von den anderen Teilen der Wand unterscheiden mag.

In polarisiertem Lichte erwies sich die zwischen zwei axialen Zellen liegende Wand als kräftig doppelbrechend (Flächenbild); der Hof leuchtete besonders hell auf. Nach Einschaltung eines Gipsplättchens Rot 1. Ordnung zeigte sich ein negatives Polarisationskreuz (bezogen auf die für Zellulose bekannten Verhältnisse). Die polarisationsoptische Untersuchung läßt also nur auf einen bescheidenen, graduellen Unterschied zwischen Hof und Umgebung schließen, so daß im optischen Verhalten die *Ceramium*-Strukturen nicht mit den von Frey-Wyssling für die Tracheidenhottüpfel geschilderten gleichgestellt werden dürfen.

Am nächsten mag es wohl liegen, einen geringen Dickenunterschied anzunehmen, von dessen Existenz und von dessen Wert ich mich indessen auf Membranquerschnitten nicht zuverlässig überzeugen konnte.

Färberisch unterscheidet sich der Hof deutlich von seiner Umgebung:

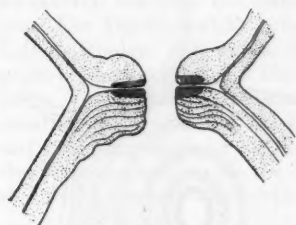


Abb. 5. Färbung der getüpfelten Wand mit Methylenblau; Die Schließhaut ist nicht erhalten.

Abb. 3 zeigt einen radialen, mit Methylenblau behandelten Längsschnitt. Der innerste Teil der Querwand hat sich kräftig gefärbt, der äußere, den ich mit der Umgebung des Tüpfelhofes identifizieren darf, war zunächst nur schwach gefärbt; nach einigen Minuten färbt sich indessen auch der periphere Anteil kräftig blau. Ich vermag nicht anzugeben, welche Faktoren bei Methylenblaufärbung zu wechselnden Resultaten führten und zuweilen den Hof des Tüpfels schwächer gefärbt bleiben ließen als seine Umgebung — wie sich namentlich für die zu den Rindenzellen führenden Tüpfel wiederholt feststellen ließ.

Über das Entfärbungsverhalten der mit Methylenblau gefärbten Membranen hat neuerdings Küster einige Beobachtungen zusammengestellt (1951 a): Bei Zusatz von KNO_3 zu den gefärbten Membranen fallen in diesen tropfen- oder scheibchenförmige, kristallinische Gebilde aus, wie sie bereits durch Borriss (1937) und Pekarek (1938) bekannt geworden sind. Auch *Ceramium*-Membranen, die mit Methylenblau gefärbt sind, lassen bei Behandlung mit KNO_3 den Farbstoff ausfallen. Die Tüpfel und ihre Umgebung zeigen dabei das auffallende Bild konzentrischer Ringe, wie ich es in Abb. 4 darzustellen versucht habe. Namentlich im Innern des Tüpfelbildes

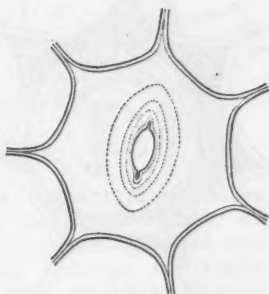


Abb. 2. Membran der Axialzelle mit ovalem Tüpfel in ebensolchem Hof.

zeigen die Niederschläge eine deutliche Anordnung zu konzentrischen Ringen. In den äußeren Anteilen der Membran sind die Niederschlagseinheiten

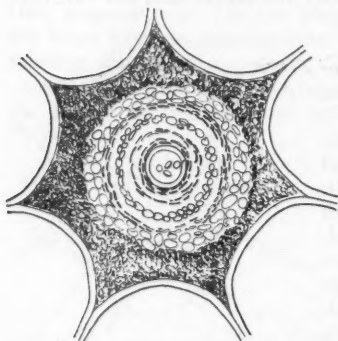


Abb. 4. Querwand nach Methylenblaufärbung und Kaliumnitratentfärbung; konzentrische Anordnung der Niederschlagspartikel.

unregelmäßig rundlich und nicht geordnet, in den inneren langgestreckt, strichförmig, zu konzentrischen Ringen geordnet. Die Anordnung und Formung der Niederschlagseinheiten weist vielleicht auf eine Reliefstruktur der Wand; doch wäre die Möglichkeit zu erwägen, daß die Micellarstruktur der gefärbten und ihren Farbstoff wieder abgebenden Wand die Anordnung der Niederschlagseinheiten bestimmt; schließlich wäre zu erwägen, ob das System konzentrischer Niederschlagsringe kausal mit den — unabhängig von jeglicher Substratstruktur entstehenden — Liesegangschen Ringen gleichzusetzen wäre. Ich wiederhole hiermit Gedanken, die Küster (z. B. 1951 c) ausgesprochen hat und verweise auf seine Bemerkung über die von den Ausfällungen ausgehenden Keimwirkungen, welche zuweilen um größere Niederschlagseinheiten ansehnlich große niederschlagsfreie Höfe entstehen lassen (Küster 1958).

sehnlich große niederschlagsfreie Höfe entstehen lassen (Küster 1958). Auch an der Oberfläche des kegelförmigen Tüpfelhohlraumes tritt starke

Methylenauffärbung ein und nach KNO_3 -Behandlung die erwähnte Entfärbung. Über das färberische Verhalten der Oberfläche der Tüpfelhohlräume hat z. B. Strugger (1949) Mitteilungen gemacht. Bei meinen Objekten waren in den Tüpfelhohlräumen zuweilen scharf gezeichnete Ringsysteme zu sehen, die ich auf eine feine Reliefstruktur oder anderweitige Auswirkungen der Membranschichtenbildung zurückführen möchte.

Auf die konzentrischen Strukturen, die sich in dem Tüpfelhof nachweisen lassen, möchte ich noch mit Schilderung einiger weiterer Färbungsversuche aufmerksam machen. Abb. 5 zeigt einen mit Methylenblau gefärbten Tüpfel, der mehr oder minder intensiv gefärbte Zonen zeigt (Breite $3-10 \mu$). Es lassen sich sieben Zonen deutlich abzählen, in anderen Fällen nur drei bis vier. Färbeversuche mit Rutheniumrot brachten

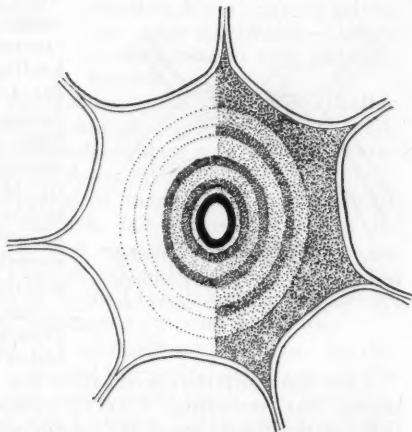


Abb. 5. Querwand nach Methylenblaufärbung; auf dem Hof sind konzentrische Ringe sichtbar geworden.

ähnliche Ergebniss, doch blieb die Deutlichkeit der auftretenden Zonen hinter der mit Methylenblau erzielbaren zurück; in günstigen Fällen zählte ich nicht mehr als drei Zonen. — Die Zonen waren in axialen Zellen wie in den Nachbarzellen gleich deutlich zu beobachten.

Bei der Deutung der Bilder möchte ich Zurückhaltung walten und es dahingestellt sein lassen, wie viele von den Ringen der Wand des Tüpfelhohlkegels zugehören und welche der in der Gesichtselebene liegenden Membranoberfläche angehören. Bei Abb. 5 bürgt schon die große Ausdehnung des Ring-systems dafür, daß nur einige der innersten Ringe dem Tüpfelkegelraum zugehören.

Auf radialen Längsschnitten fiel zuweilen die starke Lamellierung der Querwände auf und zugleich Knickungen der Liniensysteme, deren Ort der Grenze des Hofes zu entsprechen schien. Derartige Fältelungen sind bei den Lamellen der Algenmembranen nicht eben selten zu sehen, und ich bin daher nicht sicher, in welche Beziehungen ich die hier beschriebenen Knickungen und Falten zu der Grenze des Tüpfelhofes bringen darf (vgl. Abb. 6).

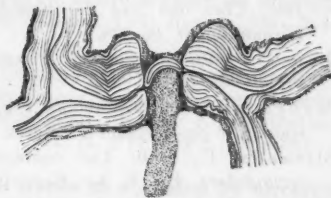


Abb. 6. Radialer Längsschnitt mit Tüpfel und Verschlussplatte; die Lamellierung der Querwand zeigt deutliche Knickung; der Tüpfelverschluß scheint hohl zu sein.

Zusammenfassung

Untersuchungen an *Ceramium rubrum* (Nordsee) machten mit Wandstrukturen bekannt, die bisher keine Beachtung gefunden zu haben scheinen. Die Tüpfel, welche benachbarte Zellen der Fäden oder ungleichartige Zellen (Rinden- und axiale Zellen) verbinden, sind umgeben von je einem großen scheibenförmigen Hof, der scharf umgrenzt sich von den peripherischen Teilen der Wand absetzt. Die optischen und färberischen Eigenschaften der Wand und des Hofes werden beschrieben; die letzteren lassen auf eine konzentrische Struktur der Wand schließen. Die Doppelbrechung des Hofes ist stärker als die der äußeren Wandteile, aber nur graduell von der der letzteren verschieden.

Literatur

- Borriß, H., 1937: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzlicher Zellenmembranen mit Anilinfarbstoffen. *Protoplasma* 28, 231.
- Frey-Wyssling, A., 1940: Der Feinbau der Zellenwände. *Naturw.* 28, 385.
- Geitler, L., 1926: Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pyrenoide. *Arch. Protistenk.* 56, 128.
- Jungers, V., 1933: Recherches sur les plasmodesmes chez les végétaux. II. Les synapses des algues rouges. *Cellule* 42, 7.
- Küster, E., 1938: Über *Hyacinthus*, ein neues zur Untersuchung der Vakuolenkontraktion geeignetes Objekt. Beiträge zur zellphysiologischen Methodik. VI. *Zeitschr. wiss. Mikr.* 55, 26.
- 1951 a: Die Pflanzenwelle. 2. Aufl. Jena.
- 1951 b: Über die Siebplatten und Siebfelder der *Curcubita*-Siebröhren und ihren Kallus (*Zeitschr. wiss. Mikr.* 66, 137).

- 1951c: Über die an gefärbten Pflanzenzellen auftretenden Entfärbungserscheinungen. *Zeitschr. wiss. Mikr.* 60.
- Kylin, H., 1937: Anatomie der Rhodophyceen. *Linsbauers Handb. Pflanzenanat.* 6, Berlin.
- 1940: Über den Bau der Florideentüpfel. *Fysiografiska Sällskapet I Lund Förhandlingar* 10, 228.
- Lanz, I., 1940: Beiträge zur Plasmamorphologie der Rotalgen. *Protoplasma* 54, 155.
- Mangenot, G., 1924: Sur les communications protoplasmiques dans l'appareil sporogène de quelques Floridées. *Rev. algol.* 1, 376.
- Miranda, F., 1930: Las comunicaciones interprotoplasmicas en *Bornetia secundiflora*. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.* 30, 201.
- Mühlendorf, A., 1937: Das plasmatische Wesen der pflanzlichen Zellbrücken. *Beih. bot. Zentralbl.* 56, Abt. A, 171.
- Pekarek, J., 1938: Über die Wirkung von Nitraten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen und Zellsäfte mit Azur I. *Protoplasma* 30, 161.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Herrn Professor Küster danke ich für die Freundlichkeit, mit der er mir die Korrekturbögen der demnächst erscheinenden 2. Auflage der „Pflanzenzelle“ zugänglich gemacht hat.

Referate.

Allsopp, C. B., and H. B. Fell: The effects of fluoro-acetate on beating embryo chick heart in tissue culture. *Exper. Cell Res.* 1, 590—594, 1950.

Methylfluoracetat in Konzentrationen bis $125 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ zeigt geringe Wirkung auf das Wachstum der Muskelkulturen in vitro, hindert aber schlagartig die Kontraktion; Methylchloracetat gleicher Konzentration tötet die Kulturen.
H. H. Pfeiffer (Bremen).

Bahr, G.: The reconstitution of collagen fibrils as revealed by electron microscopy. *Exper. Cell Res.* 1, 605—606, 1950.

Elektronenmikroskopisch ergibt die Untersuchung der aus Kollagen Geweben nach Huzella und Nageotte in verdünnten Säuren rekonstituierten Fibrillen Segmentierungen mit einer Hauptperiode von 655 Å und grubige Vertiefungen, welche Störungsmuster enthüllen.
H. H. Pfeiffer (Bremen).

Balazs, A., and H. J. Holmgren: The basic dye-uptake and the presence of a growth-inhibiting substance in the healing tissue of skin wounds. *Exper. Cell Res.* 1, 206—216, 1950.

Bestimmungen der Bindungskapazität für Toluidinblau durch 1—30 d. alte Granulationsgewebe von Ratten ergaben eine Zunahme von 2—3 γ/mg Gewebe am ersten Tage bis 7 γ am 6. bis 9. Tage und ein Absinken zu Werten wie bei normalen Geweben bis zum 15. Tage. Beherrscht werden dürfte die Farbbindungskapazität von extrazellulären Mukopolysacchariden. Kulturen von Fibroblasten unter Zusatz wässriger Extrakte der Granulationsgewebe ergeben Wachstumshemmung, maximal bei 6—9 d. alten Geweben, während der Zusatz von physiologischer NaCl-Lösung das Wachstum steigert. Auf die Bezugnahme auf das histologische Verhalten bei der Wundheilung kann hier nur hingewiesen werden.
H. H. Pfeiffer (Bremen).

Bullough, W. S.: Mitotic activity in the tissues of dead mice, and in tissues kept in physiological salt solutions. *Exper. Cell Res.* 1, 410—420, 1950.

Nachweis, daß beim Töten in Gang befindliche Mitosen bis zum Abschluß fortgesetzt werden können und Kerne von Tumorzellen während des Überlebens neu in Teilung zu treten vermögen. Das stützt die Ansicht, daß Glukose und O_2 als kritische Substanzen für Mitosen nur zu deren Einleitung, nicht aber der Fortführung erforderlich sind. Bei Kultur in Locke läßt sich die Dauer des Überlebens von Epidermiszellen noch beträchtlich steigern.
H. H. Pfeiffer (Bremen).

Fernández-Morán, H.: Sheath and axon structures in the internode portion of Vertebrate myelinated nerve fibres. *Exper. Cell Res.* 1, 309—340, 1950.

Unter Vergleich mit lichtoptischen, Röntgenbeugungs- und früheren elektronenmikroskopischen Befunden wird im Elektronenmikroskop die von einer äußeren Faserlage (200 Å dickes Neurilemma) umschlossene Scheide in konzentrische Ringe geteilt gefunden, von welchen 50 Å dicke Lamellen ausgehen. Statt des konzentrisch-lamellösen Aufbaues aus

je 80 Å dicken Quer- und Längsschichten wird im Nerven nach Alkohol-Atherextraktion eine Gliederung in 30–40 Å dicke Lamellen erhalten, und andere lamellare Strukturen treten nach Digestion mit Trypsin auf und entsprechen vielleicht durch Os- oder Formolfixierung dargestellten Strukturen. Ein dichtes Netz knotiger Fibrillen von 100–200 Å Dicke bildet die Grundlage für das Retikulum des Axolemma. Im Achsenzyylinder zeigen 100–200 Å dicke knotige Filamente mit einer bestimmten axialen Periodizität ein mit granulärer Substanz ausgefülltes Netzwerk.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Harman, J. V.: Studies on Mitochondria II. The structure of mitochondria in relation to enzymatic activity. *Exper. Cell Res.* 1, 394–402, 1950.

Nachdem die vorangegangene Mitt. (ebendort 1, 382–393, 1950) die Mitochondrien als morphologische Träger des Systems der Cyclophosphase nachzuweisen versucht hat, wird hier aus dem Verhalten der Gebilde in deionisiertem Wasser gefolgert, daß sie als gelartige Strukturen aufzufassen sind und einer semipermeablen Membran unterliegen.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Kihlman, B.: 8-Ethoxycaffeine, an ideal inducer of structural chromosomal changes in the root tips of *Allium cepa*. *Exper. Cell Res.* 1, 135–138, 1950.

Der genannte 8-äther und ähnlich auch Allyloxycoffein und Propyloxycoffein (Konz.: 10 mmol/l und geringer) permeieren durch die Kernmembran und rufen an den Interphasedchromosomen Verklebungen und Strukturveränderungen hervor, welche durch die Agentien wegen deren hohen Permeabilität und geringen Toxizität ausgezeichnet nachgewiesen werden können.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Osterhout, W. J. V. 1950: Distant effects of toxic agents. *Journ. gen. physiol.* 34, 279–284.

— Injury in relation to cell organisation. *Journ. gen. physiol.* 34, 321–323.

Nitella-Internodial-Zellen werden an ihrem einen Ende toxisch wirkenden Lösungen (meist 0,3 m Essigsäure) ausgesetzt, während das Mittelstück mit Mineralöl bedeckt ist und das andere Ende sich in Wasser befindet. Vaselinebarrieren hindern das Ineinanderfließen der Flüssigkeiten. An der Eindringstelle des Giftes zeigen sich keine wesentlichen Änderungen in der Zelle (fixierende Wirkung der Essigsäure!); solche treten bereits nach 1 Minute am entgegengesetzten Zellende in Form von Chloroplasten-Deformationen usw. auf, während das in Öl liegende Mittelstück über eine halbe Stunde unverändert bleibt und sogar noch eine Zeitlang Plasmaströmung zeigt. Wird etwa ein Drittel der Zelle der Essigsäure ausgesetzt und der restliche Teil ganz mit Öl bedeckt, bleibt in letzterem die Plasmaströmung bis zu 3½ Std. erhalten; in Wasser geht die Zelle innerhalb weniger Minuten zugrunde. Isotonische Zuckerlösung hat die gleiche Wirkung wie Öl. — Diese bemerkenswerten und bislang einzeln dastehenden Befunde über eine Fernwirkung toxischer Agentien werden mit einem Austritt gelöster Stoffe an der Stelle der Gifteinwirkung und dadurch verursachten Wassereintritt an dem entgegengesetzten Ende der Zelle, wodurch an der Wassereintrittsstelle irreversible Veränderungen des Plasmas (Koagulation) bewirkt werden, erklärt.

O. Härtel (Graz).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, und Prof. Dr. Josef Spek, Rostock, Zoologisches Institut. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

1
5
6
1
1



Sammelreferat

Treiber, E. Der übermolekulare Aufbau der Cellulose (II. Teil).....	367
---	-----

Kurze Mitteilung

Hütter-Kanert, Maria. Über die Täpfel von <i>Ceramium</i>	397
---	-----

<u>Referate</u>	403
-----------------------	-----

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt

Wiesner, Gertraud. Untersuchungen über Vitalfärbung von <i>Allium</i> -Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen.....	4. 7. 1950
Härtel, Otto. Färbungsstudien an der pflanzlichen Kutikula.....	29. 1. 1951
Höfler, Karl. Plasmolyse mit Natriumkarbonat. (Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen.).....	28. 2. 1951
Kropfisch, Maria. Spaltöffnungszahl und Heteroauxin.....	6. 3. 1951
Url, Walter. Permeabilitätsverteilung in den Zellen des Stengels von <i>Taraxacum officinale</i> und anderer krautiger Pflanzen.....	21. 3. 1951
Pfeiffer, Hans H. Eine neue Mikromethode zur Bestimmung der Lichtbrechung von Protoplastatropfen.....	7. 4. 1951
Ziegenspeck, Hermann und Hugo Ziegenspeck. Über den Aufbau der Wandungen von <i>Cladophora glomerata</i> im Lichte der verfeinerten Methoden der Lichtmikroskopie.....	10. 4. 1951
Schmidt, Heinz-Herbert. Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten. (II. Untersuchungen über die Streifen- und Näpfchenbildung der Chloroplasten).....	17. 4. 1951
Härtel, Otto. Die Stachelkugeln von <i>Nitella</i>	26. 4. 1951
Troll, Wilhelm. Die protoplasmatische Organisation. (Dem Gedächtnis Ernst von Brückes.).....	15. 5. 1951
Schwöbel, Wilhelm. Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms.....	15. 5. 1951
Kuhl, Willi (unter Mitarbeit von Gertrud Kuhl). Mikrodynamische Untersuchungen an der lebenden Zelle von <i>Actinosphaerium eichhorni</i> Ehrbg. unter Änderung des Zeitmomentes (Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse).....	15. 5. 1951
Keller, R. and S. S. Wanderman. Experiments with Distant Effects of Protoplasm.....	18. 5. 1951
Stadelmann, Eduard. Eine verbesserte Durchströmungskammer.....	16. 6. 1951
Kenda, Griseldis, Irmtraud Thaler und Friedl Weber. Kern-Kristalloide in Stomata-Zellen?.....	4. 7. 1951
Kenda, Griseldis, Irmtraud Thaler und Friedl Weber. Sphärit-Bildung aus <i>Cirsium</i> -Zellsaft.....	10. 7. 1951
Höfler, Karl und Luise Höfler. Osmoseverhalten und Nekroseformen von <i>Euglena</i>	11. 7. 1951
Toth, Annemarie. Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht.....	17. 7. 1951
Thielke, Charlotte. Sekundäre Membranverwachsungen im Bereich der Spaltöffnungen am Blütenstengel von <i>Narcissus poeticus</i> L. (Kurze Mitteilung.).....	6. 8. 1951

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von Lothar Geitler, Wien

Soeben erschienen:

Band XCVIII, 1. und 2. Heft

(Abgeschlossen im April 1951)

Mit 56 Textabbildungen. 216 Seiten

S 132.—, DM 33.60, \$ 8.—, sfr. 34.40

Inhalt: Leonhardt, R. Phylogenetisch-systematische Betrachtungen. II. Gedanken zur systematischen Stellung bzw. Gliederung einiger Familien der Choripetalen. — Buxbaum, F. Die Phylogenie der nordamerikanischen Echinocacteen. *Trib. Euechinocactineae* F. BUXB. — Cufodontis, G. *Pittosporum* in Aethiopien. — Berger, W. *Pinus stellwagi* KINK. aus dem Unterpliozän (Pannon) von Wien. — Napp-Zinn, K. Anatomische und morphologische Untersuchungen an den Involucral- und Spreublättern von Compositen. — Geitler, L. Über rechtwinkelige Schneidung von Scheidewänden und dreidimensionale Zellverbände. — Baum, Hermine und W. Leinfellner. Die Plazenta des dorsiventralen *Cuphea*-Gynözeums. — Geitler, L. Der Bau des Zellkerns von *Navicula radiosa* und verwandten Arten und die präanaphasische Trennung von Tochtercentromeren.

Österreichische Zoologische Zeitschrift

Herausgegeben von Otto Storch, Wien

Soeben erschienen:

Band III, 1. und 2. Heft

(Abgeschlossen im März 1951)

Mit 29 Textabbildungen. 246 Seiten. S 140.—, DM 32.70, \$ 7.80, sfr. 33.50

Inhalt: Koenig, O. Das Aktionssystem der Bartmeise (*Panurus biarmicus* L.). 1. Teil. — Abel, E. Über das Geruchsvermögen der Eidechsen. — Schremmer, F. Zur Biologie der Larve von *Hermione (Oxycera) calceata* und *Hermione Meigeni* Staeg. (Diptera, Stratiomyidae). Zugleich ein Beitrag zur Fauna hygropetrica. — Goetsch, W. Ergebnisse und Probleme aus dem Gebiet neuer Wirkstoffe. — Donner, J. Erste Übersicht über die Rotatorienfauna einiger Humusböden.

Kreisschlüssel

Zum Bestimmen der heimischen Pflanzenfamilien

Von Gertraud Albl-Aichinger, Institut für angewandte Pflanzensoziologie,
Arriach bei Villach, Kärnten

Mit 8 Textabbildungen und 1 Ausschlagtafel. 16 Seiten: Lex.-8°. 1951.

S 12.—, DM 2.50, \$ —.60, sfr. 2.60

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

